

Facultad de Medicina

**Departamento de Bioquímica
y Biología Molecular**



Universidad de Alcalá

TESIS DOCTORAL

**Desarrollo y validación de nuevas metodologías para la
caracterización de la interacción de ligandos con ADN.**

**Estudio de la unión de cromóforos catiónicos
heteroaromáticos con potencialidad intercalante**

Verónica García Hernández

2009

“[...] Without understanding molecules we can only have a very sketchy understanding of life itself. All approaches at a higher level are suspect until confirmed at the molecular level.”

Francis Crick, *What Mad Pursuit*, 1988

AGRADECIMIENTOS

La mayor parte de las veces todo está dicho, pero como no quisiera que quedase nada sin decir, me gustaría escribir unas palabras de agradecimiento a todas las personas con las que he compartido el tiempo que me ha llevado elaborar esta tesis.

Ha sido un largo camino que emprendí gracias a Alberto y a Juanjo, a los que tanto debo, de los que tanto he aprendido y sigo aprendiendo, que me han llevado de la mano en este camino e incluso muchas veces, cuando no me llevaban de la mano, me ayudaban a aprender a andar sola. Siempre os estaré agradecida, por la oportunidad que me habéis dado, por vuestras enseñanzas y confianza en mí.

Gracias a mi familia, que siempre está ahí, aguantando los buenos y los malos momentos, que de todo ha habido y con todo hemos ido aprendiendo, ¡y lo que nos queda! Gracias por confiar en mí (muchas veces más que yo...), por escucharme, por apoyarme y por los esfuerzos que siempre hacéis por tratar de entender “estas cosas del ADN”. Gracias a Pablo, que un poco más y puede defender esta tesis, porque ha aprendido más de Biología Molecular que yo de polinomios y espacios de Banach, ¡eso sin duda! Siempre gracias a mis padres, a mi hermano y también a Marta, Asun, Chema, entre otros y entre otras cosas, por entusiasmaros conmigo.

Gracias a los grupos que me han “adoptado” y acogido como una más, en mayor o menor medida: Pepa Toro y sobre todo, Antonio Chiloeches (que siempre ha procurado hacerme sentir como una más), Antonio Jiménez, Ana Bajo, parte de Química Analítica y del Departamento de Orgánica. Gracias a todos con los que he compartido trabajo, espacio, comidas, cenas, viajes, ... y que han hecho que esto mereciese la pena.

Todo esto empezó con Gero, Miguel, Esther, Jesús y como no, Selma, Fran, Laura e Irene,. Gracias a ellos y también a todas las Anas, Sandras, Evas, David, Pablo, Juan, Claire, Mali, Javi, Juan F., Kilian, Andrés y al personal de Cultivos. Sabéis que a muchos ya os echo de menos. Muchas gracias por todo, por vuestra ayuda, por vuestra compañía, por tan buenos ratos y a algunos más, por vuestra amistad.

Gracias a todo el Departamento de Bioquímica: profesores, becarios y como no, a Angélica, la secretaria más eficiente, servicial y agradable y a la que tanto le debemos todos los que pasamos por aquí.

Gran parte de este trabajo no hubiera sido lo mismo, o incluso no hubiera sido posible, sin el apoyo de Federico. Gracias a ti, a tu entusiasmo por la ciencia, por los artículos y por las colaboraciones con PharmaMar y con Servier. Por supuesto, gracias a PharmaMar, en especial a Carlos, Carmen y José María.

Y por supuesto, gracias al personal de la Unidad la Unidad de Biología Molecular, principalmente a Pilar Rubio y como no, a tantos becarios que han ido pasado por allí y con los que he compartido muchos buenos ratos de espera. De hecho, debo decir que la mayoría de la gente del edificio de Genética y Biología Celular ha tenido siempre una sonrisa las miles de veces que nos hemos cruzado por los pasillos, lo que siempre es agradable (¿verdad Ruth, Angelines, Esther, Yolanda, Guillermo, Miguel, etc.?). De la misma manera, gracias a otras tantas personas de Fisiología.

Y a todos mis amigos, que tanto habéis aguantado (que si esto no me sale, que si vaya con las goteras, ...), que siempre estáis ahí, aunque a veces sea para decirme que os vuelva a contar qué es eso tan raro que hago en el laboratorio, ¿verdad Grego, María, Carlos, Rocío, etc., etc.? Y como no, gracias a Emilio, con quien hablaba tantas y tantas veces, incluso desde el laboratorio y a quien siempre echaré de menos.

Gracias a vosotras, Maribel, Cris, Laura, Eva, que tanto compartimos, que tanto me entendéis y que estáis siempre ahí.

A veces las cosas no son como se podía esperar en un principio, pero siempre ha habido un lado positivo: de todo se aprende. Gracias por enseñármelo.

Gracias a todos.

Verónica

A mi familia

(la biológica, la elegida, la política y la científica)

RESUMEN / SUMMARY

The goal of promoting or repressing gene expression by low molecular weight ligands is closely related with advances in our understanding of the DNA recognition reaction. Besides, there are notable applications in molecular biology of ligands with sequence selective DNA binding.

The central objective of this dissertation is to deepen in the knowledge of DNA recognition of several ligands, mainly by the development of a new miniaturised assay.

Available analytical assays for the determination of the potential selectivity interaction of a particular compound to DNA suffer the drawback that none are applicable to the high-throughput screening required to explore libraries of compounds in a systematic search for new and more selective DNA binders. In the introduction to this dissertation there is a brief review of concepts, data and methodologies related with DNA binding ligands. Special focus is made with intercalative agents.

In addition, we describe the development and characteristics of a method that fulfil the expected purposes and its application to almost a hundred of ligands of diverse DNA binding modes.

For this screening method we use synthetic oligonucleotides containing a fluorophore attached to deoxyribose at the 5' position in one strand and a quencher in the 3' position of the complementary. In double strand DNA fluorescence is quenched as fluorophore and quencher are in close proximity. When the strands melt, both are separated and there is a large increase in fluorescence. Ligand presence causes an increment in the temperature at which half DNA molecules are dissociated, therefore their strands are separated (melting temperature, T_m).

These experiments are carried out in the real time thermocycler *Fast-7500 Sequence Detection System* from ABI-PRISM. This equipment provides us with a spectrofluorimeter where constant temperature variations can be established. It requires small amounts of material (typically 20 μ l reaction mix total volume) and can perform 96 melting profiles in parallel. This makes feasible that the determination of the preferred sequence be fast, sensitive and quantitative and also allows carrying out the analysis of a high amount of specific double stranded DNA sequences. The procedure has relevant advantages comparing to DNA denaturalization detection by other techniques, like UV absorbance.

Method's utility has been validated with compounds binding DNA by different mechanisms. Thus, we have analysed minor groove DNA binding ligands (DAPI and Hoescht 33258), the monointercalative agents etidium bromide and doxorubicin, several bisintercalators (TOTO-I, thiocoraline-A and echinomycin), compounds that bind covalently to DNA (ecteinascidins and derivatives) and ligands with a complex way of DNA binding, such as the γ -carboline bis-salt AMP-10.15 or S223906-1, which binds to single-stranded DNA. For model compounds, results are consistent with those obtained by traditional procedures such as footprinting.

This assay has also been applied to a library of cationic heteroaromatic compounds based on benzimidazole, benzothiazole, carboline and azolodiazines heterocycles, with potential intercalative properties, that were synthesized by our group. For these ligands, gel intercalation assays were performed as well before the determination of their general DNA preference (AT versus GC).

ÍNDICE

ÍNDICE	11
ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS	17
OBJETIVOS.....	23
INTRODUCCIÓN	27
1. EL ADN COMO DIANA DE UNIÓN	30
2. MODOS DE UNIÓN DE LIGANDOS AL ADN	35
3. INTERCALACIÓN	37
4. TÉCNICAS EMPLEADAS PARA EL ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LIGANDOS CON EL ADN.....	48
Determinación de la secuencia preferente de unión al ADN	58
MATERIAL Y MÉTODOS	65
1. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD Y MODO DE UNIÓN AL ADN	67
1.1. Ensayo de relajación de plásmido en gel de agarosa	67
1.2. Análisis electroforético de plásmido superenrollado y relajado	67
2. OLIGONUCLEÓTIDOS	68
2. 1. Diseño computacional de las secuencias	70
2.2. Preasociación de oligonucleótidos	71
3. PREFERENCIA O ESPECIFICIDAD DE SECUENCIA	72
3.1. Procedimientos basados en electroforesis capilar para la determinación de la preferencia de unión de ligandos al ADN	72
3.2. Método de determinación de preferencia de secuencia y afinidad en la unión de ligandos al ADN basado en curvas de disociación térmica de ADN.....	73
Ensayo en placas multipocillo	74

Curvas de disociación y asociación	74
Análisis de los datos.....	75
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	79
1. PROCEDIMIENTOS BASADOS EN ELECTROFORESIS CAPILAR PARA LA DETERMINACIÓN DE LA PREFERENCIA DE UNIÓN DE LIGANDOS AL ADN.....	81
2. MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE PREFERENCIA DE SECUENCIA Y AFINIDAD EN LA UNIÓN DE LIGANDOS AL ADN BASADO EN CURVAS DE DISOCIACIÓN TÉRMICA DE ADN	85
2.1. Diseño experimental	85
2.2. Aplicación y validación del método con compuestos de diferente naturaleza y modo de unión	87
2.2.1. Compuestos con unión a los surcos	90
2.2.2. Agentes intercalantes	92
2.2.3. Compuestos con unión covalente al ADN.....	103
2.2.4. Compuestos con unión compleja al ADN.....	113
3. APLICACIÓN DEL ENSAYO BASADO EN EL ANÁLISIS DE CURVAS DE FUSIÓN AL ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN CON ADN DE CROMÓFOROS CATIÓNICOS CON NITRÓGENO CUATERNARIO EN POSICIÓN CABEZA DE PUENTE	118
3.1. Cromóforos derivados de bencimidazol y benzotiazol.....	121
3.2. Cromóforos derivados de carbolina	138
3.3. Cromóforos derivados de azolodiazina.....	153
3.4. Bis-sales basadas en cromóforos de γ -carbolina.....	167

CONCLUSIONES.....	177
REFERENCIAS	181

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS

A:	adenina
ADN:	ácido desoxirribonucleico
ARN:	ácido ribonucleico
Å:	Angstrom(s) (0,1 nanómetros)
BSA:	albúmina de suero bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
C:	citosa
cm:	centímetro
D:	cadena doble de ADN o dúplex
DAPI:	diaminofenilindol
DM:	simulaciones de dinámica molecular
DMSO:	dimetil sulfóxido
DSC:	calorimetría de barrido diferencial (<i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
ΔC_p :	variación de la capacidad calorífica
ΔG :	energía libre de Gibbs
ΔG^0 :	energía libre de Gibbs estándar
ΔH :	entalpía
ΔH^0 :	entalpía estándar
ΔL_k :	índice de enlace (<i>linking number</i>)
ΔS :	entropía
ΔS^0 :	entropía estándar
ΔT_m :	incremento de temperatura de fusión (<i>melting temperature</i>)
EDTA:	ácido etilendiaminotetraacético
EMSA:	ensayo de movilidad electroforética (<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>)
ESI-MS:	espectrometría de masas de ionización por electrospray
ET743:	ecteinasidina-743 (trabectedina o Yondelis [®])
η :	viscosidad
θ :	elipticidad
FAM:	6-carboxi-fluoresceína
FEO:	flujo electro-osmótico
FID:	ensayo de desplazamiento de un intercalante fluorescente (<i>Fluorescent Intercalator Displacement</i>)
G:	guanina
G4:	G-cuadrupelexos
HPLC:	cromatografía líquida de alta resolución (<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)
HTS:	cribado de alto rendimiento (<i>High-Throughput-Screening</i>)
ITC:	calorimetría de titulación isotérmica (<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>)

K:	grados Kelvin
kb:	kilobases (o kilopares de bases) esto seria kpb, en ingles kbp
kcal:	kilocaloría(s)
K_{eq} :	constante de equilibrio
kV:	kilovoltio(s)
L:	ligando
LB:	(medio) Luria-Bertani
λ :	longitud de onda
MALDI:	desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (<i>matrix-assisted laser desorption ionization</i>)
mbar:	milibar(es)
MC:	simulaciones de Monte Carlo
ME:	minimizaciones de energía
MHEC:	metil-2, hidroxietil-celulosa
ng:	nanogramo(s)
nm:	nanómetro(s)
μ l:	microlitro(s)
μ g:	microgramo(s)
pb:	pares de bases
PEL:	perturbaciones de la energía libre
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
R:	constante de los gases ($8.314472 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$) o bien plásmido bacteriano relajado (según contexto)
REPSA:	selección y amplificación de fragmentos protegidos del corte por endonucleasas de restricción (<i>Restriction Endonuclease Protection Selection and Amplification</i>)
RMN:	Resonancia Magnética Nuclear
s:	segundo
S:	cadena sencilla de ADN
S-:	plásmido bacteriano con superenrollamiento negativo
SELEX:	evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (<i>Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment</i>)
SPR:	<i>Surface Plasmon Resonance</i> (Resonancia de plasmón de superficie)
σ :	densidad de superhélice
T:	temperatura (según contexto)
T:	timina (según contexto)
TAE:	Tris-Acético-EDTA
TAMRA:	tetrametilrodamina

TB:	trabectedina (Yondelis o ET-743)
TBP:	proteína que se une a la caja TATA (<i>TATA-box-binding protein</i>)
T _m :	temperatura de fusión (<i>melting temperature</i>)
TOF:	espectrómetro de masas basado en el análisis del tiempo de vuelo (<i>Time of Flight</i>)
TOTO:	homodímero de naranja de tiazol (<i>Thiazole Orange homodimer</i>)
T _w :	torsión o vuelta (<i>twist</i>)
UV:	ultravioleta
VBA:	<i>Visual Basic for Applications</i>
YOYO:	homodímero de amarillo de oxazol (<i>Oxazole Yellow homodimer</i>)
W _r :	retorcimiento (<i>writhe</i>)

OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis es profundizar en un mejor conocimiento básico del proceso de unión de ligandos al ADN, mediante el desarrollo y optimización de una metodología de alto rendimiento para determinar la selectividad de secuencia de unión de diversos ligandos al ADN, que suministre una información relevante con un mínimo consumo de tiempo y reactivos para cada compuesto analizado, permitiendo así su aplicación tanto para el estudio de compuestos discretos como de quimiotecas formadas por un elevado número de ligandos.

Como objetivos específicos se han planteado:

- 1) El estudio de un número importante de compuestos de una nueva familia de sistemas heteroaromáticos con nitrógeno cuaternario en posición cabeza de puente, con capacidad potencial de unión al ADN. El estudio persigue, en primer lugar, determinar, la capacidad de unión al ADN para todos los compuestos sintetizados y evaluar si el modo de unión es intercalativo.
- 2) Para aquellos compuestos que muestren unión por intercalación al ADN estudiar su potencialidad como intercalantes selectivos mediante la determinación de su selectividad de secuencia utilizando el método desarrollado.

En el contexto del objetivo general, se ha pretendido desarrollar un procedimiento alternativo a los descritos en la literatura y habitualmente empleados para la determinación de la selectividad de secuencia ya que, hasta el momento, ninguno de ellos puede aplicarse, de forma razonable, a un volumen de compuestos elevado, tanto por consideraciones temporales como por su elevado coste.

Teniendo en cuenta que un número significativo de los compuestos sintetizados en el grupo y estudiados en esta Tesis Doctoral presentan actividad desde moderada a relevante como compuestos antiproliferativos ($IC_{50} = 10^{-5}$ - 10^{-8} M), el conocimiento de su potencial interacción con ADN posibilita una mejor comprensión de los factores estructurales que pueden contribuir a la misma en las diversas familias de los compuestos catiónicos sintetizados y, eventualmente, ayudar en la búsqueda de uno o varios cabeza de serie.

Por otra parte, la posibilidad de utilizar este conocimiento para el diseño de compuestos con una selectividad de secuencia predeterminada, jugando simultáneamente con cromóforos intercalantes y cadenas de unión (o *linkers*) entre cromóforos, podría permitir

el planteamiento futuro de proyectos enfocados sobre dianas funcionales definidas por, o dependientes de secuencias concretas de ADN, y tal vez incidir en aspectos potencialmente muy interesantes, pero sin duda difíciles, de regulación de la expresión génica. Asimismo, existen otras potenciales aplicaciones para compuestos intercalantes como los aquí descritos, como su uso como reactivos potencialmente útiles en investigación biomédica o para aplicaciones diagnósticas en la detección de mutaciones. Estas aplicaciones pueden surgir de determinadas propiedades químico-físicas de los compuestos sintetizados, como son la fluorescencia y cambios de ésta dependientes de la unión al ADN, la selectividad de secuencia en la unión, o la estabilidad de los complejos formados con ADN.

INTRODUCCIÓN

El diseño de compuestos con capacidad de unión a secuencias específicas de ADN tiene gran importancia en farmacología dado que existen numerosos fármacos que tienen el ADN como diana y cuya actividad terapéutica se basa en la afinidad y selectividad de su interacción con el mismo [1]. Por otro lado, estos ligandos de bajo peso molecular con capacidad de unión a secuencias predeterminadas de ADN pueden ser herramientas de gran utilidad en biología molecular [2].

Para comprender en toda su complejidad la interacción entre el ADN y estos ligandos se debe combinar la caracterización del mecanismo de unión a resolución prácticamente atómica, con datos termodinámicos de las energías de unión a oligonucleótidos [3]. Existen diversos métodos para estudiar esta unión pero generalmente presentan desventajas como el alto coste por ensayo (en tiempo, reactivos o fungible), falta de sensibilidad o imposibilidad de automatización. De ahí la utilidad de desarrollar un ensayo rápido y eficaz, capaz de identificar el sitio preferente de interacción entre el ADN y compuestos de diferente naturaleza [4].

A lo largo de este trabajo se expondrá un método novedoso que puede ser considerado como método de alto rendimiento para cribado de un gran número de compuestos que se unan al ADN. Este método aporta mejoras significativas en aspectos como consumo de reactivos y de tiempo por ensayo, que tradicionalmente han limitado la determinación experimental de la selectividad de secuencia ligando-ADN.

Previamente, se introducirán conceptos y datos sobre la interacción de ligandos con ADN, incidiendo especialmente en la unión por intercalación. Asimismo, se hará una recopilación de las técnicas comúnmente empleadas para la detección y caracterización de la unión ADN-ligando, destacando las ventajas e inconvenientes que presentan, fundamentalmente para su aplicación al estudio de quimiotecas.

1. EL ADN COMO DIANA DE UNIÓN

Para que una molécula sea una diana terapéutica es necesario que exista interacción con otra molécula que module su función. No cabe duda de la importancia del estudio de este tipo de interacciones con el ADN como diana, teniendo en cuenta su implicación en numerosos procesos básicos para la vida de la célula (ver cuadro 1) y su gran complejidad estructural. Esta molécula, cuya estructura en doble hélice es conocida desde 1953 [5], es un potencial blanco de unión para numerosos compuestos. Esta unión puede tener consecuencias relevantes tanto en los ámbitos experimental como diagnóstico y/o terapéutico.

En primer lugar, los cambios físico-químicos que puede conllevar la propia unión tanto en el ADN como en los ligandos pueden ser de utilidad para la detección de ADN en general, o bien de la presencia o ausencia de determinadas regiones o secuencias dentro de él (por ejemplo, en el caso de mutaciones).

En segundo lugar, a través de su interacción con el ADN, algunos compuestos pueden modular las importantes actividades de esta molécula en los organismos vivos [6]. Cabe destacar el cáncer, caracterizado fundamentalmente por una división celular incontrolada. Esta proliferación o división celular continua implica la replicación del material genético, cuyo soporte físico es el ADN. Por otra parte, es una enfermedad originada por acumulación de mutaciones que alteran la funcionalidad o regulación de ciertos genes, cuyos productos controlan la proliferación celular. Estos dos hechos hacen de la molécula de ADN una relevante diana en investigación oncológica.

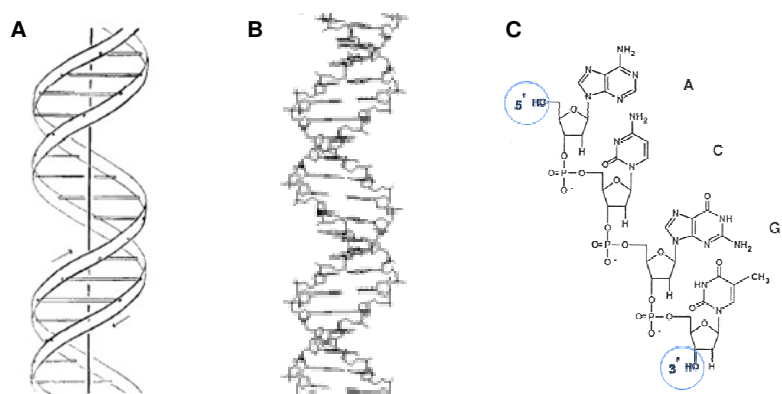


Figura 1. A: Diagrama de la estructura de la doble hélice de ADN. De Watson y Crick, *Nature* 171, 737-738 (1953): “Las dos tiras representan a las dos cadenas azúcar-fosfato y las líneas horizontales a los pares de bases uniendo a ambas cadenas. La línea vertical marca el eje de la fibra”. **B:** Modelo molecular de la misma estructura. **C:** Oligonucleótido de cadena sencilla con secuencia ACGT.

<ul style="list-style-type: none"> ♦ Procesos <ul style="list-style-type: none"> ▪ Replicación ▪ Reparación (muchos procesos distintos) ♦ Enzimas implicados en el metabolismo del ADN <ul style="list-style-type: none"> ▪ Topoisomerasas ▪ Telomerasa ♦ Expresión génica <ul style="list-style-type: none"> ▪ Transcripción en general ▪ Unión de factores de transcripción ▪ Otros mecanismos
--

Cuadro 1. Principales procesos en los que interviene el ADN que son susceptibles de modulación por interacción con ligandos.

<ul style="list-style-type: none"> ♦ Secuencia: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Única ▪ Repetida ▪ Preferente ♦ Estructura: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Cadena sencilla / Doble hélice ▪ Curvaturas en la doble hélice ▪ Variantes estructurales: <ul style="list-style-type: none"> - Horquillas de replicación - Uniones de varias vías (ver figura 3) - G-cuadrupelexos (ver figura 4) - Otras conformaciones

Cuadro 2. Principales determinantes estructurales de la interacción de ligandos con ADN.

Las características que hacen del ADN un blanco para la unión de potenciales fármacos pueden ser diversas (ver cuadro 2). Así, puede ser determinante desde la estructura tridimensional hasta la propia disposición u orden de las bases en el ADN (secuencia) [7].

La secuencia puede ser única, repetida (pequeñas islas repetidas, tripletes, etc.) o bien con una cierta acumulación de cierto tipo de bases en determinadas zonas, como las regiones ricas en GC (guanina-citosina) o AT (adenina-timina) y esto puede favorecer o impedir la

interacción con ligandos. Puede ocurrir la interacción con el esqueleto ribosa-fosfato (menos común) o con las bases nitrogenadas, que presentan grupos químicamente reactivos (como los átomos N7 de adenina y guanina).

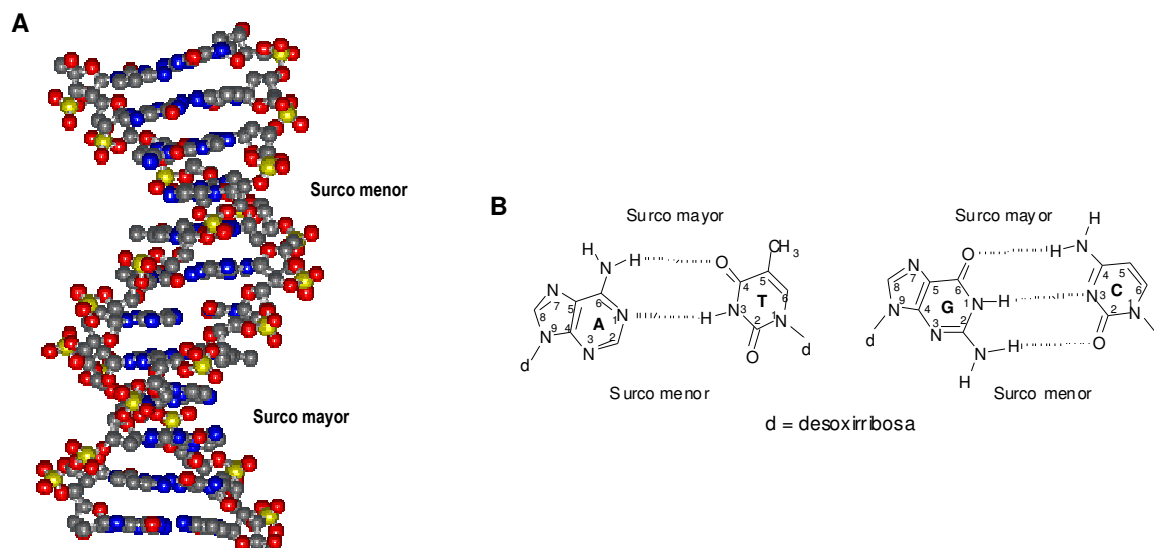


Figura 2. A: Estructura del ADN-B en la que se muestra la localización de los surcos mayor y menor. **B:** Estructura y orientación de las bases en los apareamientos tipo Watson-Crick y surcos mayor y menor.

La propia estructura del ADN puede ser el determinante relevante para que éste se comporte como diana farmacológica. Existen moléculas cuya unión con el ADN puede estar focalizada simplemente hacia una única cadena sencilla o hacia la doble hélice (ligandos inespecíficos, con diversos modos de unión). Por su interés terapéutico, tienen especial importancia los compuestos que se unen a la cadena doble de ADN. En este caso, puede existir una mayor afinidad por el surco mayor o por el menor (ver figura 2). En el caso de ciertos compuestos, la presencia de curvaturas en la doble hélice puede mejorar la afinidad o la actividad (por ejemplo, el fármaco *Trabectedine*® se une de forma selectiva al surco menor del ADN y lo curva hacia el surco mayor, causando una modificación que termina ocasionando la muerte de las células cancerosas por apoptosis [8]). Por otra parte, el ADN de cadena doble es capaz de adoptar diferentes conformaciones (tabla 1) en función de su hidratación, composición o secuencia de bases y de la cantidad de cargas positivas del medio. La flexibilidad del ADN permite que se den cambios significativos *in vivo* respecto de la canónica conformación B, como ocurre con la estructura de la caja TATA (región del ADN esencial para la expresión génica ya que en ella se inicia la transcripción por la ARN-polimerasa), que al unírsele la proteína TBP (*TATA-box-binding protein*), el ADN asume una forma más próxima a la conformación A [9-11].

Tabla 1. Conformaciones A, B y Z del ADN de cadena doble y sus propiedades.

	A	B	Z
Altura por pares de bases (Å)	2.3	3.4	3.8
Diámetro de la hélice (Å)	25.5	23.7	18.4
Sentido de giro	Dextrógiro	Dextrógiro	Levógiro
Pares de base por vuelta de hélice	11	10.4	12
Longitud de una vuelta (Å)	25.3	35.4	45.6
Inclinación de los pares de bases respecto al eje	19º	1º	9º

Por otro lado, hay ligandos que pueden interaccionar con otras numerosas variantes estructurales, de gran importancia por su aparición en procesos celulares relevantes, como las horquillas de replicación (ver imagen representativa en figura 3.A) o las uniones de tres (*3-way junctions*) y cuatro vías (ambas pueden aparecer implicadas en recombinación, reparación y otros procesos importantes para la célula) o bien los G-cuadruplexos (ver figura 4). Una posible aplicación de estos compuestos puede ser precisamente la detección de este tipo de estructuras [12].



Figura 3. Uniones de varias vías con un ligando intercalado. A: unión de tres vías. B: unión de cuatro vías. Extraído de [12].

Los G-cuadruplexos o G4 son asociaciones laterales de cuatro hebras de ADN. Estas estructuras ocurren en ciertas secuencias ricas en guanina y son muy estables. Hay evidencias de que pueden aparecer en las regiones teloméricas de los cromosomas y en las regiones reguladoras de algunos genes (particularmente oncogenes) [13]. Dada la peculiaridad de estas conformaciones locales del ADN y su posible implicación funcional en procesos relevantes para la proliferación celular, constituyen una interesante diana biológica para el diseño de compuestos potencialmente antiproliferativos. La inhibición de la actividad telomerasa (enzima encargada del mantenimiento de los telómeros, presente en el 85-90% de los cánceres humanos) puede tener importante repercusión sobre la capacidad proliferativa [14]. Se ha visto relación entre la actividad de compuestos que inhiben a la telomerasa y la capacidad de dichos ligandos para interaccionar y estabilizar G4. Los compuestos estudiados en esta tesis presentan las dos características básicas presentes en la

mayoría de los estabilizadores de cuádruplexos: poseen una estructura altamente plana y son especies cargadas. Se trata de un campo prometedor y que ha dado lugar a numerosos trabajos, recogidos en varias revisiones [15-22].

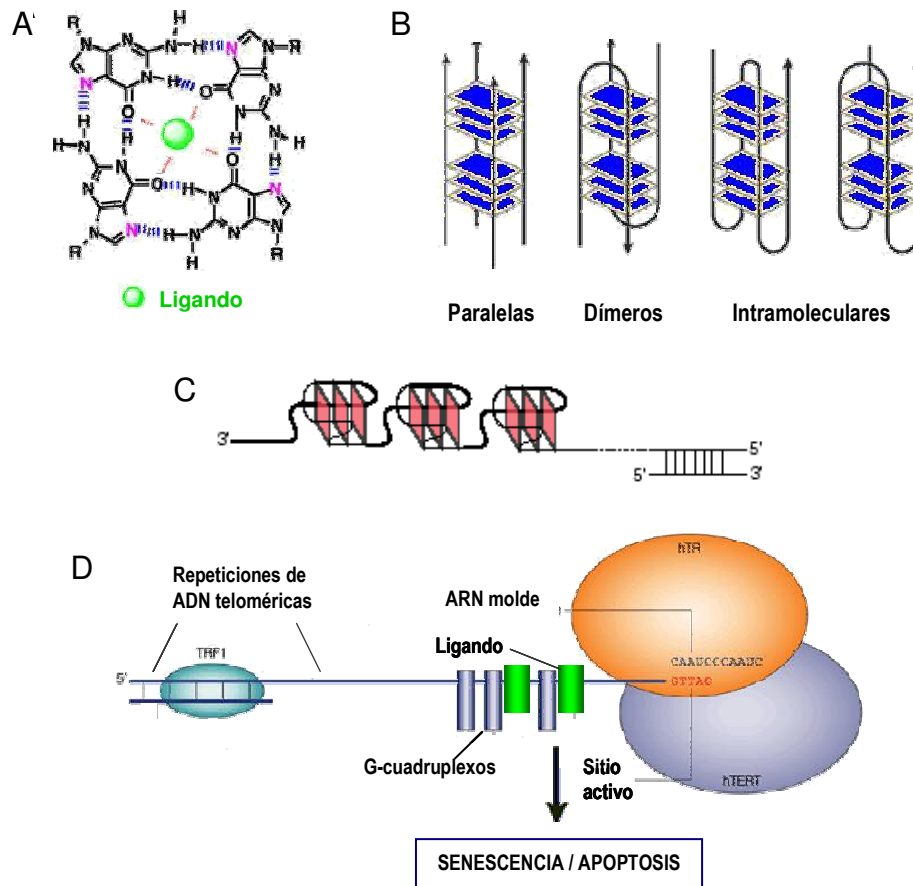


Figura 4. G-cuádruplexos. **A:** Uniones entre las guaninas de los G4 y un ligando. **B:** Algunas posibles topologías con las orientaciones de las hebras mostradas con flechas. **C:** Modelo esquemático de la estructura secundaria de los telómeros humanos [23]. **D:** Modo de acción de los inhibidores de la telomerasa.

Finalmente, hay otras muchas conformaciones posibles del ADN que pueden ser blanco de diversos compuestos, debido a la gran diversidad de secuencias y posibles estructuras que éstas pueden determinar. Además, se pueden unir al ADN moléculas de diferente naturaleza, como más moléculas de ADN (se unen hasta tres cadenas sencillas formando triples hélices y hasta cuatro cadenas como ocurre en los G-cuádruplexos), ARN (dando lugar a un complejo de baja estabilidad) [24, 25], proteínas (enzimas, factores de transcripción), oligosacáridos, iones (cationes inorgánicos por unión electrostática) y compuestos orgánicos de distinta naturaleza.

2. MODOS DE UNIÓN DE LIGANDOS AL ADN

Según el tipo de interacción, podemos clasificar la unión como covalente (se producen enlaces de tipo covalente entre el compuesto y el ADN, que son estables e irreversibles) o no covalente (como las uniones por enlaces de hidrógeno o las interacciones electrostáticas). Presentan unión covalente los agentes alquilantes y los análogos de nucleótidos. La unión no covalente se divide a su vez en varios subtipos de unión, destacando la unión a los surcos y la intercalación.

Los agentes alquilantes se unen covalentemente a las pirimidinas, específicamente a los átomos N7 de las adeninas y guaninas, e incluso al N2 y N3 y fueron los primeros compuestos usados en quimioterapia. Según el tipo de mecanismo pueden dar lugar a mutaciones, o bien generar uniones entre dos cadenas del ADN (*cross-link*), lo que bloquea por ejemplo la replicación. Pertenecen a este grupo las mostazas nitrogenadas, compuestos con platino como el *cis*-platino o el carboplatino, las etilenaminas, los alquilsulfonatos, las nitrosoureas, los triacenos o la mitomicina C [26-28].

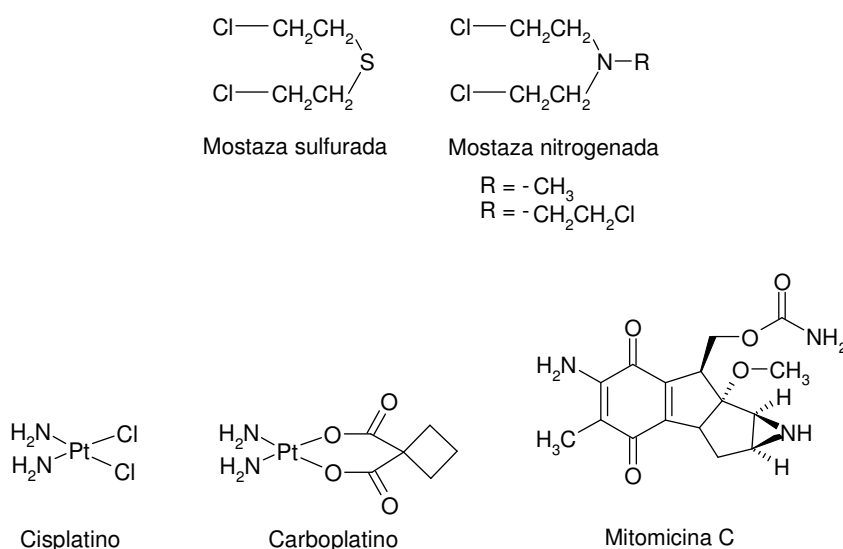


Figura 5. Estructura de algunos agentes alquilantes.

Los análogos de nucleótidos se incorporan en el ADN, pudiendo impedir su síntesis y/o alterar el ciclo celular. Son ejemplos el AZT-monofosfato y 3TC- monofosfato [29], o el tenofovir [30], empleados como inhibidores de la transcriptasa reversa (todos utilizados frente a VIH y el último también frente a hepatitis B) [31-33] y la citabina y la gemcitabina, usados en el tratamiento de cáncer pancreático [28, 34, 35].

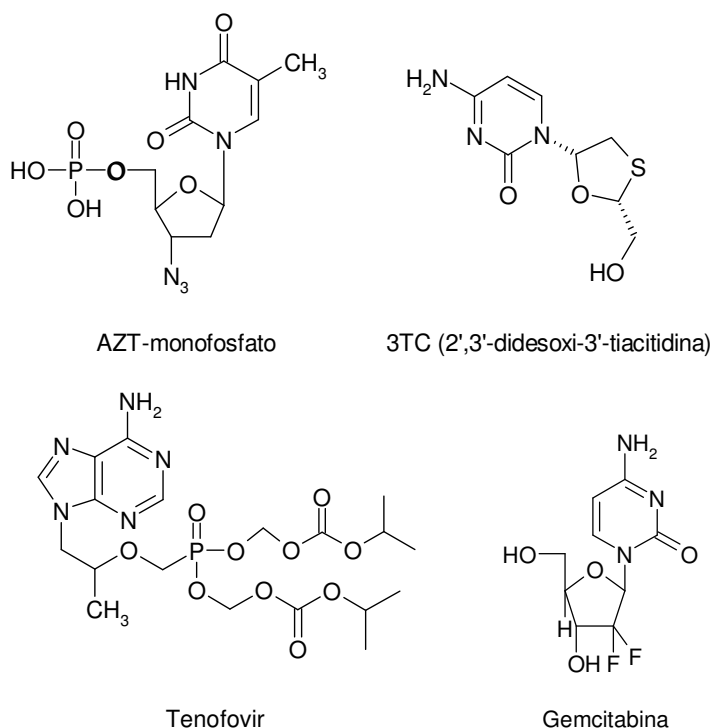


Figura 6. Estructura de algunos análogos de nucleótidos.

Los compuestos que se unen por los surcos se suelen unir al surco menor. Por lo general, son estructuras alargadas y con múltiples grupos capaces de formar puentes de hidrógeno. Ejemplos destacados son la distamicina A, un antibiótico obtenido de la bacteria *Streptomyces distallicus* o la netropsina, antibiótico de *Streptomyces netropsis*. [27], así como ciertas poliamidas [36-38].

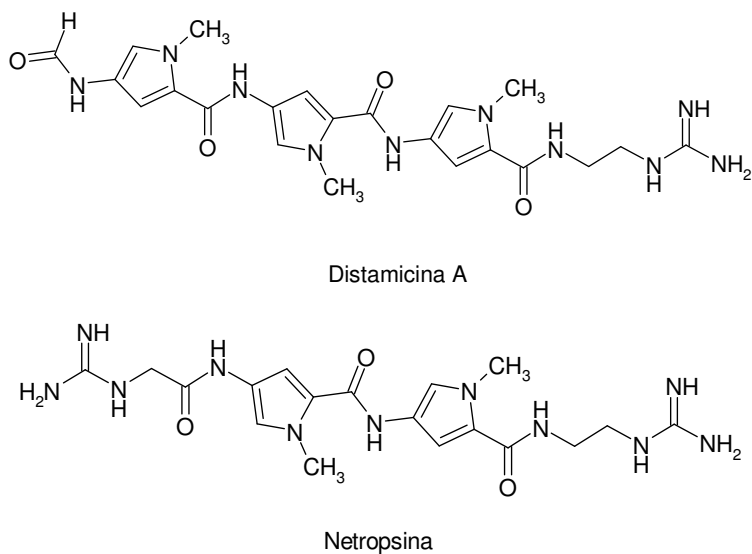


Figura 7. Estructura de la distamicina A y la netropsina.

Los agentes intercalantes se insertan entre dos pares de bases adyacentes. Son compuestos que suelen contener anillos aromáticos planos. Este tipo de unión al ADN se tratará más extensamente en el siguiente apartado.

Algunos ligandos no covalentes presentan una unión mixta. Hay un gran número de ligandos cuya unión es combinación de intercalación y unión por el surco. Este tipo de compuestos suelen estar formados por varias subestructuras, como los bis-intercalantes, formados por dos cromóforos que intercalan, unidos por una cadena que se une a los surcos. La unión al surco puede favorecer tanto la especificidad como la afinidad de la unión, siendo ejemplos representativos la actinomicina D y el ditercalinio.

Por otra parte, recientemente se ha descubierto un nuevo modo de unión: en el punto de cruce de tres dobles hélices (unión de tres vías), que se manifiesta durante alguna de las etapas de división celular y que se ha visto en distintas formas de cáncer y otras enfermedades como la distrofia muscular miotónica o la corea de Huntington [39].

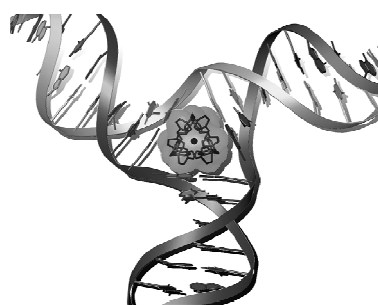


Figura 8. Representación de la unión de un ligando a un ADN de tres ramales (tomado de la ref. [39]).

3. INTERCALACIÓN

El fenómeno de la intercalación

La palabra “intercalación” proviene del latín *intercalare*, que significa insertar. Fue introducida por primera vez en 1961 por Lerman [40] para describir la unión entre un tipo de acridinas y el ADN. Se define como la inserción coplanar de un compuesto entre dos pares de bases adyacentes.

Los intercalantes suelen ser o estar formados principalmente por estructuras policíclicas, planas, generalmente sistemas aromáticos o heteroaromáticos π -deficientes, que tienen la capacidad de insertarse entre las bases nitrogenadas del ADN. Debido a su estructura electrónica absorben fuertemente en el UV y son sustancias coloreadas, por lo que se suele

usar el término “cromóforo” para referirse a este tipo de sistemas. Las fuerzas que sustentan este tipo de unión se basan en fenómenos de apilamiento o *stacking* (fundamentalmente transferencia de carga y dispersión *London*) [41-43] e interacciones hidrofóbicas [44, 45]. En el proceso de intercalación intervienen numerosos factores como los efectos estéricos, electrostáticos, hidrofóbicos, entrópicos, la facilidad de desapilamiento de bases o la naturaleza de las bases que flanquean el sitio de unión, que hacen de la intercalación un proceso extraordinariamente complejo y todavía no bien comprendido.

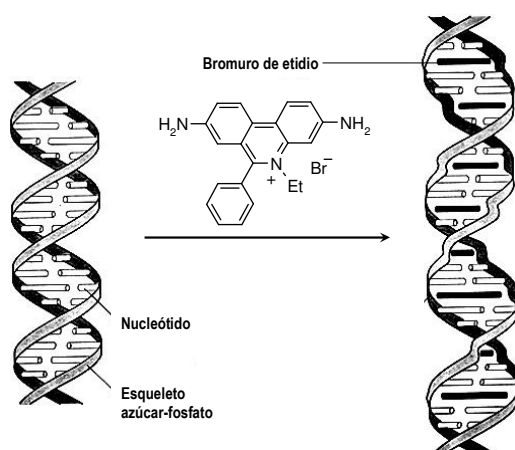


Figura 9. Esquema de la unión del intercalante bromuro de etidio a un fragmento lineal de ADN.

Tipos de intercalación

La forma más elemental de inserción de un cromóforo en una cadena de ADN, que corresponde con lo descrito (ver ejemplos en las figuras 9 y 10.A), se denomina monointercalación.

También puede darse la unión de dos o más cromóforos que se encuentran unidos mediante una cadena adecuada (*linker*), dando lugar a la poli-intercalación [46, 47]. El caso más común y sencillo es el de los bis-intercalantes (figura 10.B). Según el tipo de cadena, ésta puede conferir una mayor capacidad de unión con el ADN si tiene también capacidad de interaccionar con él, como suele ocurrir con los bis-intercalantes formados por dos cromóforos intercalantes unidos por una cadena que se une a los surcos, pudiendo favorecer tanto la especificidad como la afinidad de la unión a través de uniones de hidrógeno complementarias entre el compuesto y el surco. Esto ocurre con la actinomicina D (con grupos intercalantes poliaromáticos y grupos peptídicos cíclicos que se unen al surco menor) o el ditercalinio (en este caso, la cadena que une a los cromóforos se une al

surco mayor). Cabe destacar que la longitud y naturaleza química de estas cadenas pueden ser muy distintas (por ejemplo, de naturaleza polimetilénica, amínica, peptídica o incluso nucleotídica [48]), pudiendo, además, ser rígidas o flexibles.

Otros casos de poli-intercalación conocidos son los tris- (figura 10.C) [49], tetra- [50] e incluso penta-intercalantes, sintetizados con el objetivo de obtener gran afinidad y potencial selectividad de secuencia [51, 52].

También existen casos particulares como la hemi-intercalación, que se produce con la unión de un intercalante a ADN de cadena sencilla (figuras 10.D) [53-57]; o como el de un derivado de la acridina (acridin-4-carboxamida) que se une a dos dúplex [58].

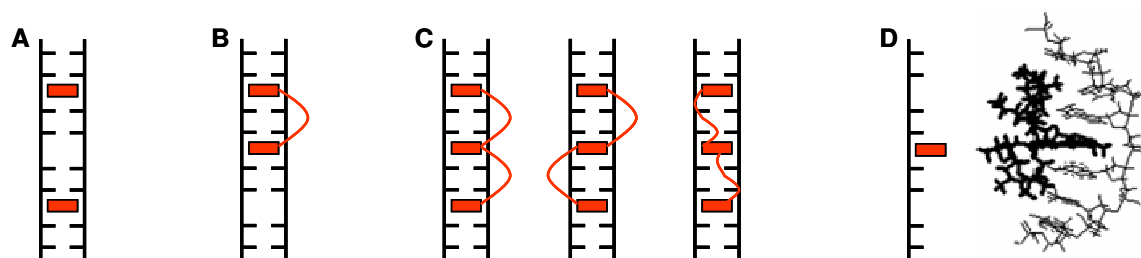


Figura 10. Representación esquemática de los distintos tipos de intercalación. **A:** Monointercalación. **B:** Bis-intercalación. **C:** Un tris-intercalante y diferentes formas en las que se puede situar la cadena de unión de los cromóforos. **D:** Hemi-intercalación. A la derecha, modelo tomado de la referencia [57]; en color negro, el intercalante (actinomicina D); en gris, el ADN (ATAGTT).

Efectos de la intercalación sobre el ADN

La interacción de cualquier ligando con el ADN, independientemente de cual sea el modo de unión, produce cambios físico-químicos en éste [59] como aumento de la masa total, disminución del coeficiente de sedimentación, disminución de la carga neta (con compuestos con carga positiva) o variación del espectro de absorción o emisión. Determinados parámetros termodinámicos de la reacción de unión difieren para compuestos que se unen a los surcos y para intercalantes (tabla 2).

Tabla 2. Datos termodinámicos medios para distintos modos de unión al ADN*.

	Unión a los surcos	Intercalantes
Energía libre de unión (ΔG)	$-9.5 \pm 1.6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$	$-7.3 \pm 0.8 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$
Rangos de entalpía (ΔH)	$-5.8 \text{ a } 10.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$	$-9.0 \text{ a } -5.3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$
$\Delta H/\Delta G$	0.33 a 1.85	0.83 a 1.97
Fuerza predominante de unión [60, 61]	Entrópica (ΔS positiva)	Entálpica (ΔH)

*: 10 datos de compuestos con unión a los surcos y 16 de intercalantes, extraídos de la revisión de la referencia [62].

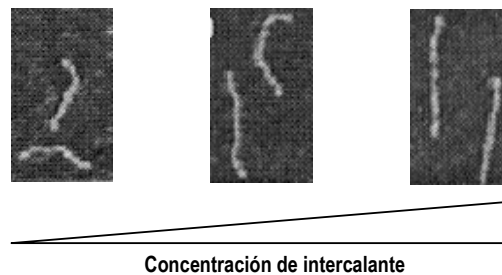


Figura 11. Aumento de longitud y rigidez producido en un fragmento lineal de ADN como consecuencia de la unión de concentraciones crecientes del intercalante ditercalinio. Fotografías tomadas de la referencia [63].

Conviene considerar que la doble hélice de ADN se encuentra plegada sobre sí misma tanto aislada en medio acuoso como *in vivo*, formando estructuras terciarias como la forma superenrollada, que es la más típica. El superenrollamiento de la cadena doble de ADN es un fenómeno análogo al que ocurre habitualmente con el cable de un teléfono. Se define como el retorcimiento o giro de una hélice sobre sí misma de forma que su eje no siga una línea recta sino otra hélice. Como la hélice de partida ya lleva implícito un enrollamiento, a la nueva hélice descrita por el eje de la primera se la llama "superhélice". Esta conformación es consecuencia de una torsión que introduce una tensión estructural en la molécula y, por tanto, sólo se mantiene si los extremos no tienen libertad de giro, por ejemplo si están formando una molécula circular covalentemente cerrada, de forma que el libre giro no pueda liberar la tensión y deshacer el superenrollamiento. El ADN se encuentra en forma circular y siempre superenrollado en bacterias y orgánulos eucarióticos (mitocondrias y cloroplastos). Además, el ADN nuclear de los organismos superiores, aun siendo lineal y no circular, forma grandes bucles retenidos mediante proteínas, bastante análogos al ADN circular cerrado. Por tanto, experimenta constantemente fenómenos de superenrollamiento en las células de todo tipo. Esta estructura se caracteriza con determinados parámetros que definen sus propiedades geométricas y topológicas. Es interesante conocerlos ya que pueden cambiar con la unión de ligandos (ver cuadro 3) [64]. En concreto, la unión intercalativa produce cambios en el superenrollamiento del ADN.

En algunos casos, el que se dé alguno de estos cambios puede incluso hacer posible diferenciar entre un modo de unión u otro. De hecho, algunos de ellos se producen sólo con la intercalación, como un aumento de la separación vertical entre los pares de bases entre los que se inserta el agente intercalante (0.34-0.68 nm para la unión de acridinas descrita por Lerman [40]), quedando el esqueleto azúcar-fosfato distorsionado y cambiando el grado de rotación entre pares de bases sucesivas [45]. Como consecuencia de esta separación entre las bases, se produce un desenrollamiento de la doble hélice (entre 10°-26°

[65]), lo que conlleva un alargamiento (figuras 9 y 11), aumento de la rigidez y viscosidad de la molécula de ADN al formarse el complejo [66].

Las **propiedades geométricas** del ADN superenrollado están relacionadas con el tamaño y la forma de la molécula e incluyen parámetros tales como la curvatura intrínseca del ADN o la formación de bucles debida a la interacción con proteínas. Retorcimiento y torsión son propiedades de este tipo, que cambian con la deformación.

El **retorcimiento**, W_r , es el número de veces que cruza la doble hélice sobre sí misma. Por convenio, es negativo para las superhélices dextrógiras (con las vueltas hacia la derecha).

La **torsión**, T_w , es el número de vueltas de la hélice de ADN. Tiene relación con el número de pares de bases por vuelta. Este número resulta modificado por la unión de compuestos intercalantes, que causan un efecto de desenrollamiento de la doble hélice con lo que T_w disminuye. Por convenio, este número es positivo para las hélices dextrógiras, negativo para las levógiras y cero en un ADN lineal.

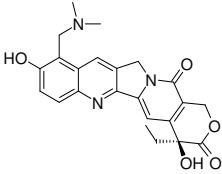
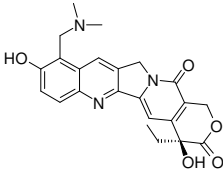
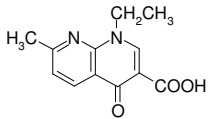
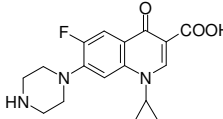
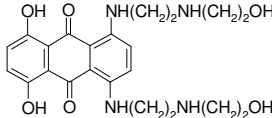
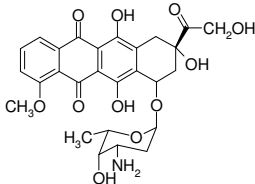
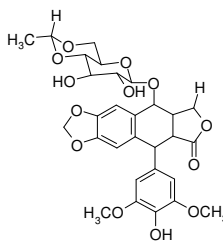
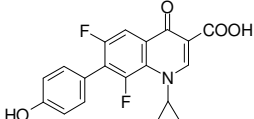
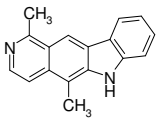
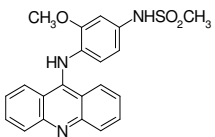
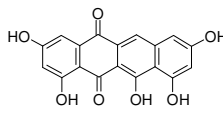
A diferencia de las anteriores, las **propiedades topológicas** como el índice de enlace, no cambian con la deformación.

El **índice de enlace**, L_k , es el número de veces que las dos hebras de la molécula están entrelazadas, es decir, unidas por un enlace topológico (no covalente). Este índice sólo cambia si se rompe un enlace fosfodiéster en una de las hebras.

Son también propiedades relacionadas con la topología la **densidad de superhélice** o nivel de superenrollamiento (σ) y la **energía libre de Gibbs** del superenrollamiento (ΔG_{sc}).

Parámetros geométricos	Parámetros topológicos
Retorcimiento (<i>writhe</i> , W_r)	Índice de enlace (<i>linking number</i>) $\Delta L_k = L_k - L_k^\circ$ Para superenrollamiento negativo $L_k < L_k^\circ$, para superenrollamiento positivo $L_k > L_k^\circ$. $L_k = T_w + W_r$
Torsión o vuelta (<i>twist</i> , T_w)	Densidad de superhélice $= \Delta L_k / L_k^\circ$ Energía libre de Gibbs: $\Delta G_{sc} = (1/N)(KRT) \Delta L_k^2$

Cuadro 3. Resumen de la descripción formal de los parámetros que definen el superenrollamiento. L_k° es el índice de enlace del ADN relajado, N es el número de pares de bases, K es una constante (aproximadamente 1050 para plásmidos de más de 2 kb), R es la constante de los gases ($8.314472 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) y T es la temperatura (en grados K).

TOPOISOMERASA I		DNA GIRASA	
			
Camptotecina	Topotecán	Ácido naxílico	Ciprofloxacino
TOPOISOMERASA II			
			
Mitoxantrón	Doxorrubicina	Etopóxido	
			
CP-115,953	Elipticina	Amsacrina	Saintopina

Cuadro 4. Estructura de diversos intercalantes clasificados según la enzima a la que inhiben.

Por otro lado, las características espectrales de algunos agentes intercalantes cambian al unirse al ADN, lo cual sirve para su empleo como marcadores de ADN. Por ejemplo, está tremendamente extendida la utilización de bromuro de etidio [67-71] o de TOTO [72-78] como marcadores fluorescentes para tinción de ácidos nucleicos en geles de agarosa, para visualizar separaciones y distinguir tamaños, como tinción celular, en estudios de movilidad celular, de transporte nucleosomal y génico, transfección, y muchas otras aplicaciones.

Efectos biológicos

Los cambios causados por la unión de compuestos intercalantes en la estructura tridimensional del ADN provocan un cambio en la funcionalidad de esta molécula. Estas alteraciones funcionales pueden ser ocasionadas por la imposibilidad, disminución o modificación de la interacción de otras moléculas con el ADN, como por ejemplo, factores de transcripción [79, 80]. Por otro lado, los compuestos unidos al ADN por intercalación

pueden impedir, dificultar o modificar la acción de determinados enzimas, como girasas [81], helicasas [82-84], ADN- y ARN-polimerasas o topoisomerasas I y II [81, 85-96].

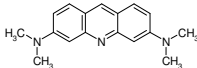
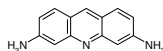
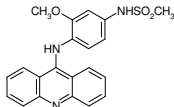
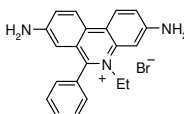
Por todo ello, este tipo de moléculas tienen una importante aplicación terapéutica como antibacterianos [56, 97, 98], antivirales [98-101], antifúngicos [102], antiparasitarios [97, 98, 103, 104] y antitumorales [47, 105, 106], entre otras [107], debido a su inhibición de la división celular.

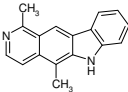
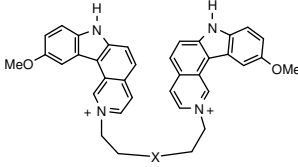
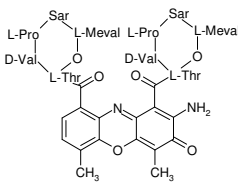
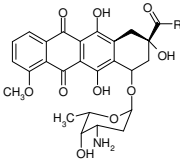
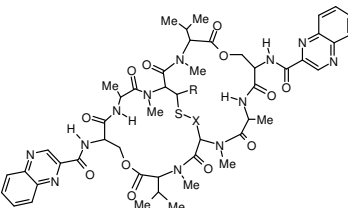
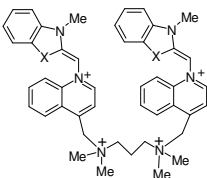
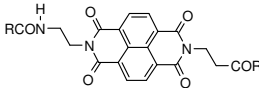
Por supuesto, fuera de este contexto, estos compuestos suelen tener efectos muy negativos, como propiedades mutagénicas, teratogénicas y carcinogénicas. También es habitual que muestren una baja especificidad de tejido celular, que conlleva una alta toxicidad (por ejemplo, se descartó el uso del bis-intercalante ditercalinio por su alta hepatotoxicidad [108-110]).

Compuestos intercalantes

En la actualidad se conoce un número muy elevado de compuestos que presentan capacidad de unión al ADN mediante intercalación. A continuación (tabla 3) se detallan una serie de intercalantes representativos y algunas de sus aplicaciones más generales o potenciales.

Tabla 3. Intercalantes representativos, algunas aplicaciones y secuencia preferente de unión (continúa en la página siguiente).

Compuesto o familia			Aplicaciones y [secuencia de unión]
Acridinas			
			Antimaláricos, antivirales, antitumorales, marcadores de ADN
Naranja de acridina	Proflavina	Amsacrina	
Bromuro de etidio			
			Marcador de ADN

Compuesto o familia	Aplicaciones y [secuencia de unión]	
Elíptica y ditercalinio		
 Elíptica	 Ditercalinio	Antitumorales [CG]
	$X = \text{N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \end{array} \text{N}$ Flexi.Di	
Actinomicina D		
		Antibiótico, antitumoral [NCGN – NCGN]
Antraciclinas		
 R = -CH ₃ Daunorrubicina o daunomicina R = -CH ₂ OH Doxorrubicina o adriamicina		Antibióticos, antitumorales [NCGN]
Equinomicina y triostina-A		
 Equinomicina: R = SMe; X = CH ₂ Triostina A: R = H; X = S-CH ₂		Antibióticos, antitumorales [NCGN]
TOTO y YOYO		
 TOTO: X = S YOYO: X = O		Marcadores de ADN [CTAG] (TOTO)
Naftalimidás y bis-naftalimidás		
		Antitumorales

Compuestos catiónicos con potencialidad intercalante

En el grupo de investigación se ha estudiado en los últimos años la potencialidad que como agentes intercalantes de ADN tienen los cationes heteroarómicos que presentan como característica estructural común un nitrógeno cuaternario en posición cabeza de puente. Este tipo de sistemas cargados, a diferencia de lo que sucede con el otro tipo posible de cationes heteroarómicos basados en la cuaternización de un nitrógeno de una azina o un azol, han sido muy poco estudiados y sus potenciales aplicaciones apenas han sido exploradas. Como el sistema catiónico más sencillo que presenta un nitrógeno cuaternario en posición cabeza de puente se conoce como quinolizinio, a menudo los sistemas que comparten esta misma característica estructural se denominan como “cationes tipo quinolizinio” para referirse a ellos de una forma genérica y distinguirlos de los que están basados en azinio o azolio.

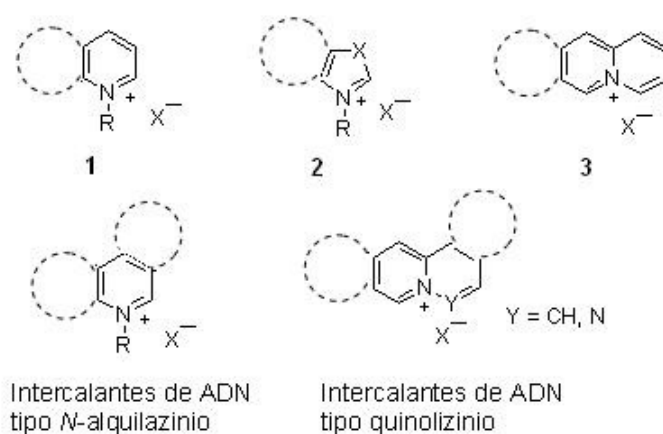


Figura 12. Tipos de cationes heteroarómicos [(1): azinio; (2): azolio; (3): quinolizinio] e intercalantes de ADN.

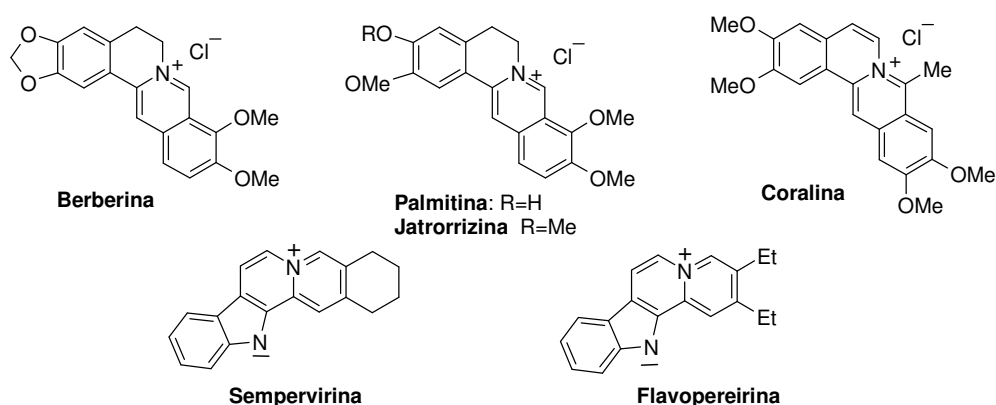
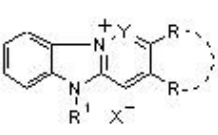
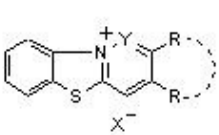
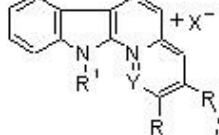
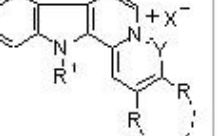
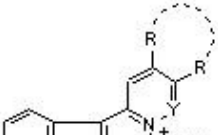
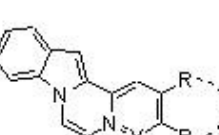
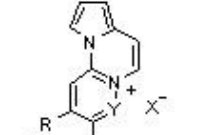
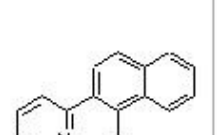


Figura 13. Ejemplos de alcaloides conteniendo el núcleo de quinolizinio.

El sistema de quinolizinio se preparó por vez primera en 1954 [111]. En la naturaleza está presente en forma dihidro en numerosos alcaloides entre los que destacan la berberina [112], probablemente el alcaloide más ubicuo en el reino vegetal (se encuentra en nueve familias botánicas). Este alcaloide y los englobados bajo la denominación de “protobarberinas” (más de 50) han sido ampliamente utilizados como antimaláricos en medicina tradicional (especialmente palmatina y jatrorrizina, entre otros) [113] (figura 13). La coralina es un inhibidor de topoisomerasa I y II [114, 115] que presenta actividad antiparasitaria (frente al tripanosomátido *Leishmania* [115, 116]) y antileucémica [117] y que interacciona con ADN por mecanismos distintos dependiendo de la concentración [118, 119]. Otros alcaloides indólicos de interés que incorporan el núcleo de quinolizinio y para los que se ha descrito actividad antiproliferativa y recientemente antirretroviral (HIV) [120, 121] son, por ejemplo, la sempervirina [121, 122] y la flavopereirina [123, 124].

Además de la importancia del núcleo de quinolizinio en los productos naturales mencionados también se han descrito actividades de interés de algunos de sus derivados como quimiosensores [125], inhibidores de proteínas quinasas [126], reguladores de canales iónicos implicados en la broncodilatación (de relevancia en asma, enfermedad obstructiva pulmonar crónica y fibrosis quística) [127-130], antagonistas de *N*-metil-D-aspartato (NMDA antagonistas) [131-133] y anti-inflamatorios [134-136].

Tabla 4. Series preparadas de cationes de tipo quinolizinio y aza-quinolizinio con potencial capacidad intercalante de ADN.

 <p>Bencimidazolio</p>	 <p>Benzotiazolio</p>	 <p>α-Carbolinio</p>	 <p>β-Carbolinio</p>
 <p>γ-Carbolinio</p>	 <p>Pirrolopirazinio</p>	 <p>Pirrolopirimidinio</p>	 <p>Azinophthalazinio</p>

Hasta el momento, en el grupo de investigación se han obtenido más de un centenar de compuestos, que pueden agruparse en ocho series basadas en distintos cromóforos para los

que se utilizará la denominación genérica del heterociclo a partir del cual se ha formado el sistema catiónico heteroaromático (tabla 4).

Además de estas series, algunos de los cromóforos obtenidos se han unido por cadenas (*linkers*) de longitud, funcionalidad y complejidad variables para generar bis-sales que puedan tener comportamiento como bis-intercalantes de ADN. En la figura 14 se representa la estructura general de este tipo de bis-sales detallando los cromóforos y cadenas utilizadas hasta el momento.

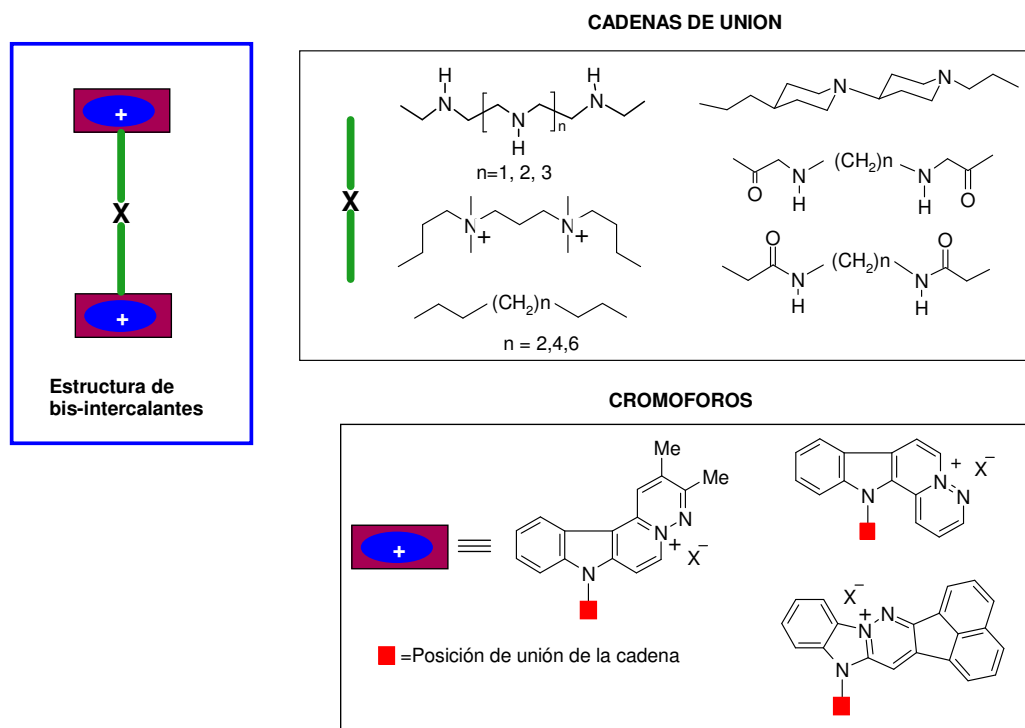


Figura 14. Estructura de bis-sales (potenciales bis-intercalantes).

4. TÉCNICAS EMPLEADAS PARA EL ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LIGANDOS CON EL ADN

La gran mayoría de las técnicas empleadas están basadas en los cambios físicos que se producen en el ADN e incluso en el propio ligando, con la formación de un complejo entre ambos. En la tabla 5 (páginas 26 y 27) se expone de manera resumida el fundamento físico-químico y las principales ventajas e inconvenientes relativos de una serie de métodos empleados para estudiar las uniones ADN-ligando.

Algunas de las técnicas más antiguas y sencillas son la viscosimetría y la centrifugación en gradiente de densidad.

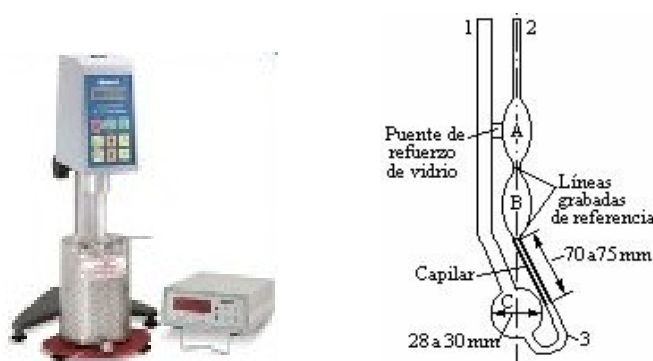


Figura 15. Viscosímetro. A la derecha, esquema de viscosímetro que utiliza el principio del tubo capilar (viscosímetro Ostwald modificado). El líquido se carga por el tubo 1, se somete al aparato a temperatura constante mediante un baño, se aspira el líquido cargado hasta el tubo 2 hasta que el bulbo B se llene totalmente y se deja caer, siendo el valor de la viscosidad el tiempo empleado (segundos) por el menisco para descender entre las dos líneas de referencia de ambos extremos del bulbo B. El aparato debe ser previamente calibrado con un fluido normalizado.

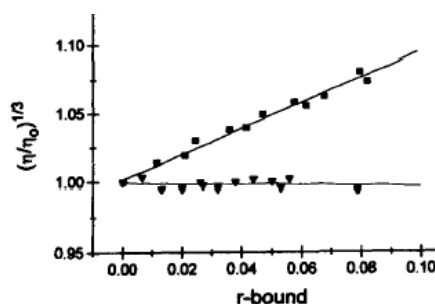


Figura 16. Viscosidad específica relativa de ADN de timo de ternera en presencia del intercalante bromuro de etidio (cuadrados) o de Hoechst 33258 (triángulos), que se une al ADN por el surco, representada en función del *ratio* de ligando unido. Tomado de la referencia [137].

Con la viscosimetría se mide la diferente velocidad de flujo al paso a través de un tubo capilar (figura 15) de una disolución de ADN libre y de ADN en presencia del compuesto de estudio. Se emplea para compuestos intercalantes ya que la unión de éstos al ADN producen un alargamiento de la doble hélice que ocasiona un aumento considerable de la viscosidad [137, 138] (ver ejemplo en la figura 16). Algunos de los compuestos desarrollados en el grupo han sido estudiados mediante esta técnica [139], [140], [141].

La centrifugación en gradiente de densidad se realiza en una solución con un gradiente lineal de densidad [142], que puede ser de sacarosa o de alguna sal como cloruro de cesio o de sodio. Se produce una sedimentación diferencial del ADN libre y del unido, así como del ligando libre y del que forme complejo con ADN [143, 144], [145].

Por otra parte, se emplean de manera muy habitual las técnicas espectrofotométricas [146], como pueden ser la espectrofotometría ultravioleta-visible, el dicroísmo circular [147, 148] (ejemplo en la figura 17, de ref. [149]) o la fluorimetría.

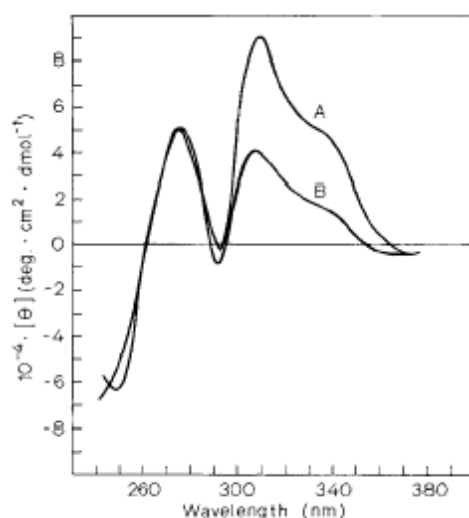


Figura 17. Espectro de dicroísmo circular de ADN en ausencia (B) y presencia (A) de bromuro de etidio. Se representa el cambio de “elipticidad” (θ) de la muestra frente a la longitud de onda (λ).

Se utiliza la espectrofotometría ultravioleta-visible porque el ADN absorbe en la franja del UV-visible, en concreto a una longitud de onda máxima de 260 nm, de manera que se pueden medir los cambios espectrofotométricos que sufren el ADN o los compuestos que se unen a él, al producirse la interacción entre ambos. En las referencias [139-141, 150] se muestran ejemplos con compuestos sintetizados en el grupo.

La fluorimetría se puede emplear en el caso de moléculas fluorescentes (que al aumentar su estado de excitación por la absorción de fotones, vuelven al estado basal emitiendo radiación fluorescente o fosforescente si se da un cambio en el espín electrónico, que hace más lenta la emisión). Este tipo de moléculas suelen estar formadas por un alto número de electrones π deslocalizados, como ocurre con los policiclos aromáticos o los dobles enlaces conjugados, así como sustituyentes electrodonadores como $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{NHCH}_3$.

La calorimetría [151] engloba a varias técnicas basadas en el uso del calor para detectar e incluso cuantificar una interacción ligando-ADN. Permiten la obtención de datos termodinámicos de la unión [148, 152]. Con un calorímetro (o microcalorímetro) se puede medir la emisión o absorción térmica (ΔH) de la reacción de unión y con ello, se puede calcular la variación de la capacidad calorífica ($\Delta C_p = (\delta \Delta H / \delta T)_p$) y la constante de unión. Destacan la calorimetría de titulación isotérmica y la de barrido diferencial. Con la calorimetría de titulación isotérmica (ITC, *Isothermal Titration Calorimetry*) se mide la emisión o absorción térmica (ΔH) a una temperatura concreta, para diferentes concentraciones de ligando (ejemplos en [148, 153] y revisión en [154]); mientras que en la de barrido diferencial (DSC, *Differential Scanning Calorimetry*, ampliamente empleada con proteínas [155]), se registra la variación de la capacidad calorífica (ΔC_p) variando la temperatura en un rango determinado [156, 157].

Las técnicas basadas en la electroforesis se utilizan, fundamentalmente, para separar partículas cargadas dentro de un campo eléctrico [158]. Se usa para el estudio de la interacción de compuestos con ADN ya que es posible separar el ADN libre del complejo ADN-ligando. Según el tipo de soporte, se puede dividir en dos tipos de electroforesis: en gel o capilar.

Electroforesis en gel. En la matriz de un gel y por efecto de la aplicación de un campo eléctrico, se va a poder separar al ADN no unido del que forme parte del complejo ADN-ligando, ya que la unión de cualquier compuesto va a conferir al complejo un cambio en la masa e incluso en la carga, que hará posible la separación ya que tendrá una diferente migración. Este tipo de método se denomina “ensayo de retardo” (EMSA, *Electrophoretic Mobility Shift Assay*) [66, 159, 160] y se emplea fundamentalmente para proteínas [161, 162].

Electroforesis capilar. Es una técnica analítica de separación apropiada para ligandos de bajo peso molecular relativo, pero su aplicación a compuestos mayores como pueden ser ácidos nucleicos [163, 164] o proteínas no está tan desarrollada por el momento. Se lleva a cabo en un tubo capilar de sílice fundida de diámetro muy pequeño (25-100 μm). Se pueden aplicar elevados voltajes (hasta 30 kV) sin que haya un excesivo calentamiento ya que en el tubo capilar se disipa el calor de forma muy eficiente.

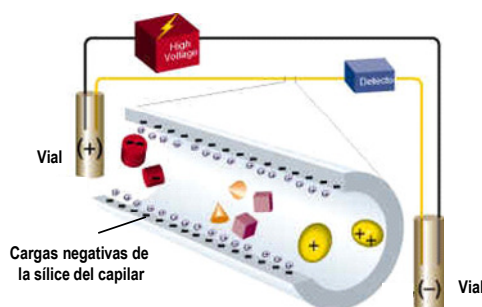


Figura 18. Representación de un capilar utilizado para una electroforesis capilar. Sus extremos se introducen en viales con disolución electrolítica y en los que se introducen unos electrodos conectados a una fuente de alto voltaje, que permite establecer la diferencia de potencial para llevar a cabo la separación. La detección se realiza en continuo sobre el tubo capilar con un detector adecuado (generalmente empleando absorción UV-visible aunque también los hay, por ejemplo, de fluorescencia) conectado a un sistema de adquisición y tratamiento de los datos.

Otra técnica muy utilizada es la denominada *footprinting*. Se basa en la protección frente a un corte enzimático o químico de una zona o secuencia de la molécula de ADN debida a la unión de un ligando a esa secuencia concreta. Para ello, se incuban fragmentos de ADN, previamente marcados radiactivamente en uno de sus extremos, con el ligando en estudio (enzimas, factores de transcripción y otros ligandos de gran tamaño) para dar lugar a la formación del complejo. Seguidamente, se trata el ADN con la enzima DNAsa I (una nucleasa que produce cortes indiscriminados) o cualquier otro agente [165] capaz de generar cortes en el ADN (como el peróxido de hidrógeno) adaptando las condiciones de la reacción para que se produzca un corte por molécula. Se visualiza el resultado de la reacción de corte en un gel de electroforesis, en el que se separarán los fragmentos por tamaño. Comparando con el mismo experimento sin emplear ligando, podrá verse cual es el fragmento al que la unión del compuesto ha protegido del corte nucleolítico [166, 167].

Actualmente se están implementando mejoras en esta técnica para hacerla menos laboriosa y de mayor aplicabilidad [168-170].

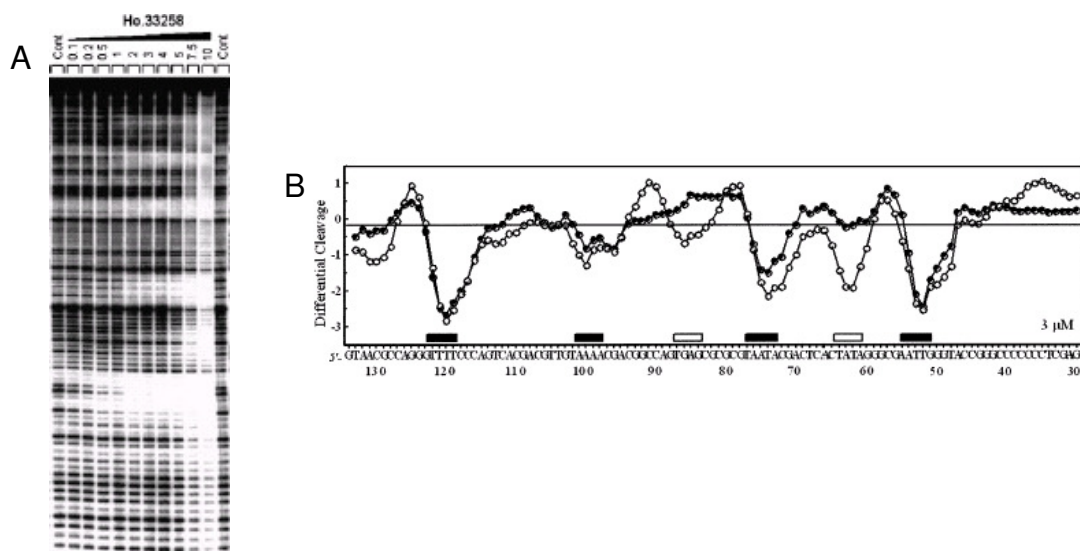


Figura 19. Ejemplo de resultados de un ensayo de *footprinting*. **A:** Gel de *footprinting* de un fragmento (174pb) de ADN de pKS tratado con DNasa-I, con concentraciones crecientes del compuesto Hoechst 33258. **B:** Representación de la susceptibilidad de ser cortado el fragmento de ADN en presencia de Hoechst 33258 y otro compuesto. Los valores positivos indican potenciación del corte, los negativos, bloqueos. Extraída de la referencia [167].

La cromatografía es una técnica de separación en la que la muestra es arrastrada por una fase móvil (un fluido) a través de una columna que contiene una fase estacionaria (un sólido o un líquido fijado en un sólido). Los componentes de la mezcla interaccionan de distinta forma con las fases, por lo que se mueven por la fase estacionaria a diferente velocidad, quedando separados en bandas dentro de la fase móvil. Una vez separados, pasan por un detector que genera una señal que puede depender de la concentración y del tipo de compuesto. Se selecciona un tipo de cromatografía según la naturaleza de la mezcla a separar. Generalmente, para ADN se utiliza la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) (ejemplos en [171-174]), que permite usar una gran variedad de fases estacionarias, ofreciendo una alta gama de interacciones selectivas y más posibilidades para la separación.

Después de utilizar un método de separación como la electroforesis capilar o la cromatografía se puede usar un espectrómetro de masas (fig. 20) como detector. Este método se desarrolló en principio para determinar el peso molecular de los compuestos químicos analizados y actualmente se usa para caracterizar mezclas químicas complejas. Para poderlo emplear para el estudio de la interacción entre macromoléculas como el ADN [175-178] es necesario ionizar y volatilizar la muestra, por lo que los tipos de espectrometría de masas más utilizados son el de ionización por *electrospray* (ESI-MS)

[179] y MALDI (al irradiar con un láser a la muestra embebida en una matriz, se volatilizan iones de ésta; desorción/ionización mediante láser asistida por matriz o *matrix-assisted laser desorption ionization*) [180]. En experimentos de MALDI, el espectrómetro más utilizado es el analizador de tiempo de vuelo (TOF), en el que la determinación se realiza en alto vacío mediante una medida muy precisa del tiempo desde la aceleración de iones en la fuente (por un campo eléctrico) hasta que impactan con el detector. Es una técnica de gran exactitud, resolución y rapidez en el análisis en comparación con otros métodos estructurales como la resonancia magnética nuclear o la difracción de rayos X.

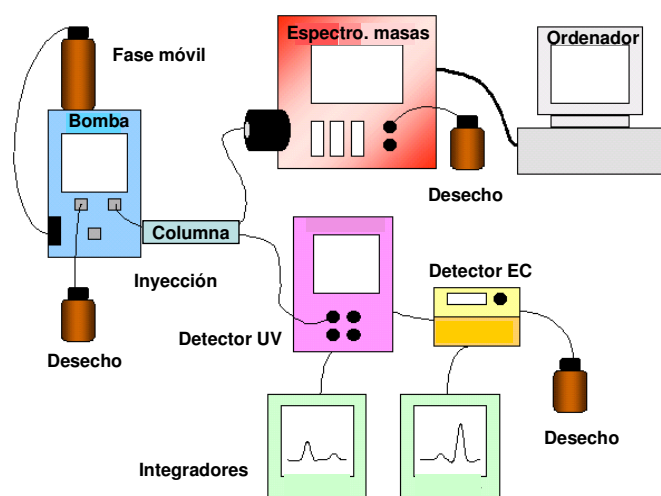


Figura 20. Representación esquemática de los distintos componentes requeridos para las técnicas de electroforesis capilar (EC), HPLC (en azul) y espectrometría de masas (rojo).

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) hace uso de las propiedades de resonancia aplicando radiofrecuencias a los átomos o dipolos entre los campos alineados de la muestra y da información estructural de la muestra. Se basa en la existencia de núcleos atómicos que poseen espín electrónico o momento intrínseco de rotación (al igual que los electrones), como por ejemplo, el protón (^1H), el ^{13}C , el ^{15}N , ^{19}F y el ^{31}P . El giro de estas partículas con carga genera un momento magnético a lo largo del eje del espín de forma que estos núcleos actúan como pequeños imanes. Al situarlos dentro de un campo magnético externo, su momento magnético se puede alinear en el mismo sentido que el campo (lo cual requiere menor energía) o en sentido contrario.

En la unión intercalativa, el apilamiento de los anillos aromáticos de las bases y de los de los intercalantes origina una deslocalización π electrónica mayor, que produce un desplazamiento de las señales de los protones aromáticos del intercalante hacia campos magnéticos de intensidad más alta.

Para determinar la secuencia preferente se comparan los espectros de resonancia de los átomos con espín electrónico de oligonucleótidos con secuencia de interés y del compuesto en estudio, por separado y una vez formado el complejo entre ambos. De esta forma se puede obtener información sobre el modo y grado de interacción que se produce con cada secuencia. Esta metodología se encuentra ampliamente descrita y revisada en la literatura, entre otros por Han y Gao [181].

Mediante la resonancia de plasmón de superficie se miden los pequeños cambios en el índice de refracción de una superficie sobre la que se encuentra depositado el posible complejo. Para la aplicación de esta técnica se debe inmovilizar el ADN sobre una superficie de oro y luego someterlo a una disolución de ligando en un flujo constante. La señal de resonancia de plasmón de superficie (SPR), medida en unidades de resonancia, está directamente relacionada con la cantidad de masa depositada sobre la superficie y, por tanto, con la concentración superficial de ligando unido [182-186]. Revisión detallada en [185].

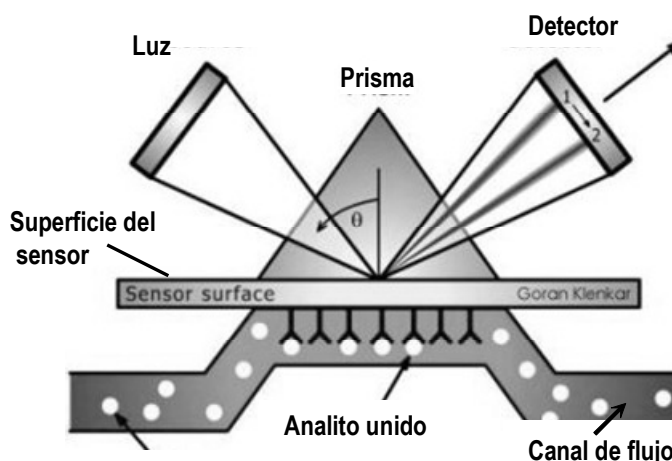


Figura 21. Representación esquemática de un dispositivo de SPR.

Gracias a distintos tipos de microscopía [63, 187-189], como la de fuerza atómica, escaneado atómico o barrido, es posible observar de modo directo el cambio producido en el ADN por la unión de diferentes ligandos. Esta metodología permite caracterizar la unión por intercalación, determinar la afinidad de la unión y el número de exclusión.

La cristalografía o difracción de rayos X es una técnica consistente en hacer pasar un haz de rayos X a través de un cristal de la sustancia sujeta a estudio. El haz se escinde en varias direcciones debido a la simetría de la agrupación de átomos y, por difracción, da lugar a un patrón de intensidades que puede interpretarse según la ubicación de los átomos en el

cristal, aplicando la ley de Bragg [190, 191]. Para formar el cristal es necesaria una disolución sobresaturada [192]. El ADN se condensa en presencia de poliaminas, cationes inorgánicos trivalentes, alcoholes y cationes divalentes [193]. Para encontrar las condiciones favorables para la formación del cristal se han de tener en cuenta una multitud de parámetros: tipos de iones metálicos y poliamidas empleadas, tipo y concentración de los ligandos de ADN, alcohol y tampón utilizado, pH, temperatura y agentes precipitantes [194]. Revisión interesante en [195] y ejemplo más reciente en [196].

Para el estudio de interacciones macromoleculares se aplican también métodos teóricos o simulaciones, que reciben el nombre genérico de modelado molecular. Se apoyan en sistemas informáticos para calcular numerosas variables de la interacción (como energías de unión), determinar el modo de unión, especificidad de secuencia, la estequiometría del complejo, la afinidad de unión, predecir cambios conformacionales sufridos por el compuesto o por el ADN, o formación o destrucción de enlaces [197, 198]. Actualmente se utilizan diversos tipos de métodos teóricos, como las minimizaciones de energía (ME), las simulaciones de dinámica molecular (MD) [196], las simulaciones de Monte Carlo (MC), y las perturbaciones de la energía libre (PEL) [146]. Este tipo de metodologías han sido también empleadas para el estudio de algunas de las series de compuestos de esta Tesis [139, 140].

El empleo de la desnaturalización térmica está muy extendido desde hace décadas [157, 196]. La cadena doble de ADN puede disociarse por efecto de un aumento en la temperatura (como también ocurre por una baja concentración de sales o una disminución en el pH del medio, o con agentes desnaturalizantes como urea). Representando el porcentaje de cadena sencilla frente a la temperatura se obtiene lo que se denomina una curva de disociación o de fusión. Estas curvas están caracterizadas por un parámetro que es la temperatura de fusión (*melting*, T_m), que corresponde a la temperatura a la cual la mitad de las moléculas de ADN se encuentran en forma de cadena sencilla. Si un ligando se une al ADN, producirá una estabilización o desestabilización, que se verá reflejada como un aumento o disminución en la T_m .

Esta es la base de la técnica empleada más extensamente en este trabajo, por lo que se expone en este apartado en mayor medida y se incidirá con más detalle también en el apartado de Resultados y discusión.

El seguimiento de la fusión o desnaturalización del ADN se puede llevar a cabo mediante diversas técnicas, como espectrometría ultravioleta, dicroísmo, o calorimetría. La termodinámica subyacente se expone a continuación.

La reacción de equilibrio de asociación-disociación de dos oligonucleótidos complementarios, S_1 y S_2 , se puede expresar como $S_1 + S_2 \leftrightarrow D$, donde D representa el ADN de doble cadena. El incremento de energía libre, ΔG , para esta reacción se puede calcular según la siguiente expresión, donde ΔG° representa el incremento de energía libre de la reacción en condiciones estándar⁷:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[D]}{[S_1][S_2]}$$

En estado de equilibrio tendremos $\Delta G = 0$, y por tanto se cumplen las siguientes expresiones, donde K_{eq} representa la constante de equilibrio de la reacción:

$$\Delta G^0 = -RT \ln \frac{[D]_{eq}}{[S_1]_{eq}[S_2]_{eq}} = -RT \ln K_{eq}$$

$$K_{eq} = \frac{[D]_{eq}}{[S_1]_{eq}[S_2]_{eq}} = e^{-\Delta G^0 / RT}$$

$$\ln K_{eq} = -\frac{\Delta G^0}{RT},$$

Por otra parte, sabemos que $\Delta G = \Delta H - T\Delta S = q_p - T\Delta S$. Combinando ambas expresiones se puede deducir la siguiente relación:

$$\ln K_{eq} = -\frac{\Delta G^0}{RT} = -\frac{\Delta H^0 - T\Delta S^0}{RT} = -\frac{\Delta H^0}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^0}{R}$$

Esto representa que $\ln K_{eq}$ es una función lineal de $1/T$, de la forma $y = mx + b$, con pendiente $m = -\Delta H^0/R$ y ordenada en el origen $b = \Delta S^0/R$. Por consiguiente, si se tiene el valor de K_{eq} a diferentes temperaturas se pueden obtener valores de ΔH^0 y ΔS^0 , y por tanto de ΔG^0 a partir de estos.

En un experimento típico de asociación o disociación térmica de ADN se parte de una mezcla de reacción con unas concentraciones de reactivos fijas y conocidas y se asume que el sistema alcanza un estado de equilibrio a una temperatura inicial, también fija y conocida. Una vez en este estado se determina, por algún procedimiento, la concentración en dicho equilibrio de alguno o algunos de los reactivos o productos de la reacción, generalmente a través de la determinación cuantitativa de alguna magnitud física o físico-química que varía de forma conocida con dicha concentración. A continuación, se impone un cambio de temperatura de forma externa al sistema, se le deja evolucionar hasta alcanzar el nuevo estado de equilibrio y se determina de nuevo la concentración en dicho equilibrio de alguno o algunos de los reactivos o productos de la reacción como antes. Si el proceso se repite para un número relativamente elevado de temperaturas, la representación gráfica de la concentración en el equilibrio del reactivo o producto antes señalado frente a la temperatura a la que se determina dicha concentración constituye una curva de fusión. Cada punto experimental de esta curva corresponde a un estado de equilibrio. Si la reacción es realmente reversible, cada uno de estos puntos es independiente del camino seguido para alcanzarlo [199].

Como se ha mencionado anteriormente, la temperatura de fusión, T_m , corresponde a la temperatura a la que la mitad de la concentración total de ADN en la mezcla se encuentra en forma de cadena doble (y consecuentemente, la otra mitad se encuentra en forma de cadena sencilla). Si en la reacción participa además un ligando, L , que se une preferentemente al ADN de cadena doble, la reacción se puede expresar como $S_1 + S_2 + nL \leftrightarrow D : L_n$, donde $D : L_n$ (DL en lo sucesivo) representa el complejo formado por el ADN de cadena doble y n moléculas de ligando, L . La constante de equilibrio para esta reacción viene dada por la expresión:

$$K = \frac{DL}{S_1 S_2 L^n}$$

Si el ligando se une preferentemente a ADN de cadena doble, cada aumento en la concentración de ligando causará un incremento en la temperatura de fusión. Esto se debe a que, para una temperatura T fija, la constante de equilibrio K ha de ser la misma, independientemente de la concentración de ligando, L . Por tanto, para que el valor de K se mantenga constante, al aumentar L es necesario que S_1 y S_2 disminuyan. Esto motiva un desplazamiento no lineal “hacia abajo” de todos los puntos que componen la curva de

fusión, que se manifiesta como un aparente desplazamiento hacia la derecha de la curva sigmoidea, es decir, hacia mayores temperaturas de fusión para concentraciones crecientes de ligando.

Sin embargo, si L se une en mayor número a la forma en cadena sencilla se observará el efecto opuesto, esto es, una disminución de T_m . Por supuesto, si el ligando se une por igual a cadena doble y sencilla, o si no se une en absoluto, no se apreciará cambio en la T_m [200].

Esto constituye el fundamento principal de la mayoría de los estudios de interacción de ligandos con el ADN basados en el análisis de curvas de asociación-disociación térmica [201].

DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA PREFERENTE DE UNIÓN AL ADN

La determinación de la preferencia de secuencia en la interacción de un ligando es un proceso bastante más complejo que el estudio de la unión de dicho ligando a la estructura general del ADN. En general, los principios en los que se basan las diversas técnicas empleadas para este tipo de estudios son los mismos que en la determinación de la capacidad de unión general, pero las estrategias deben adaptarse para conseguir extraer información sobre las subsecuencias específicas a las que se une preferentemente el ligando.

Además de algunos de los métodos antes mencionados como *footprinting*, resonancia magnética nuclear, difracción de rayos X o calorimetría, existen otros que permiten estudiar específicamente la preferencia de secuencia de unión de ligandos al ADN, como son el ensayo de desplazamiento de un intercalante fluorescente (FID, *Fluorescent Intercalator Displacement*), REPSA (*Restriction Endonuclease Protection Selection and Amplification* o selección y amplificación de fragmentos protegidos del corte por endonucleasas de restricción), SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment* o evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial), el método de la diálisis competitiva o los biosensores o chips de ADN.

En el ensayo de desplazamiento de un intercalante fluorescente, la unión de un ligando a secuencias concretas de ADN puede detectarse mediante la cuantificación de la disminución de la fluorescencia emitida por otro intercalante (generalmente bromuro de

etidio o naranja de tiazol) con el que compete por la unión y al que terminará desplazando, en mayor medida cuanto mayor sea la afinidad del compuesto en estudio por esa secuencia [202-205].

El método denominado REPSA consiste en la selección y amplificación (por PCR o reacción en cadena de la polimerasa) de fragmentos protegidos del corte por endonucleasas de restricción debido a la unión de un compuesto en la secuencia específica en la que iba a cortar la enzima. Se presenta una revisión reciente en Van Dyke *et al*, 2007 [206].

Para llevar a cabo una evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial o SELEX, se debe fijar el ADN o el ligando en un soporte (biosensor o chip) y se podrán seleccionar aquellos ligandos que quedan unidos por afinidad. A los fragmentos de ADN empleados en esta técnica y capaces de ser reconocidos o de reconocer un ligando, uniéndose a él, se les conoce como “aptámeros”. Posteriormente se amplifican los fragmentos de ADN que se han unido, con el fin de enriquecer la mezcla con estas secuencias. Se repite varias veces el proceso de selección y amplificación. El tratamiento del gran número de datos obtenidos mediante esta técnica (suelen estudiarse quimiotecas de ligandos o de secuencias) requiere el uso de complejas herramientas matemáticas [4, 207]. Se trata de una estrategia muy potente, pero muy susceptible a artefactos de difícil control. La denominación como “evolución” se basa en que el paso de amplificación puede introducir errores, que tendrían un papel semejante a las mutaciones en la evolución biológica como fuente de diversidad. Revisiones en Gopinath, 2007 y James, 2001 [208, 209].

La diálisis competitiva consiste en contener diferentes secuencias de ADN separadas cada una en un tubo de diálisis y determinar la cantidad de ligando que pasa a cada una. Aquella a la que haya pasado una mayor cantidad será la que contenga la secuencia de mayor afinidad [196, 210].

Todas estas técnicas son de amplio uso actualmente, pero como ya se ha mencionado, no pueden ser aplicadas para el estudio de un gran número de compuestos que, además, puedan presentar distintos modos de unión al ADN y de los cuales se tenga una baja disponibilidad, como ocurre en muchos casos y en concreto, para muchos de los compuestos estudiados a lo largo de este trabajo. En la tabla 5 se muestra un resumen de las ventajas e inconvenientes de cada una de las técnicas mencionadas.

Tabla 5 (continúa en las páginas siguientes). Resumen de técnicas para el estudio de la unión de ligandos al ADN y algunas de sus características más destacables.

TÉCNICA y su BASE FÍSICO-QUÍMICA	VENTAJAS	INCONVENIENTES
Viscosimetría Aumento de viscosidad de una disolución de ADN debido al alargamiento de la molécula al formarse los complejos intercalativos (fig. 9).	Detecta unión intercalativa. Discrimina entre mono- y bis-intercalación.	Mucha intervención manual. Requiere cantidades altas de reactivos (por ej., ADN 1mM) [137].
Centrifugación en gradiente de densidad Aumento de densidad por la unión del ligando	Útil para estudios con proteínas.	Volúmenes muy elevados. No discrimina entre uno u otro tipo de unión.
Espectrofotometría UV-visible Cambios espectrofotométricos en el ADN o el ligando al producirse la interacción entre ambos, debido a modificaciones en su estructura electrónica	Permite conocer la existencia de interacción, la estequiometría del complejo ligando-ADN, el tamaño del sitio de unión y datos cinéticos.	No da información sobre el tipo de unión. Inadecuado con compuestos con $\lambda_{\text{máx}}$ 260 nm, como el ADN. Volúmenes elevados.
Dicroísmo circular Cambios espectrofotométricos (distinta dispersión de luz polarizada circularmente) al variar la estructura del ADN con la formación del complejo	Se emplea tanto para ácidos nucleicos como para proteínas, para estudiar interacciones y estructuras [147].	Requiere una instrumentación específica. Volúmenes elevados.

TÉCNICA y su BASE FÍSICO-QUÍMICA	VENTAJAS	INCONVENIENTES
Fluorimetría Variación del espectro de fluorescencia de ligandos fluorescentes al estar unidos a ADN	Sensibilidad alta.	Sólo puede emplearse con moléculas fluorescentes.
Calorimetría Emisión o absorción térmica (ΔH) de la reacción de unión. Destacan la ITC y la DSC.	Permite obtener datos termodinámicos y cinéticos.	Requiere una instrumentación específica. Volúmenes elevados.[211].
Desnaturalización térmica Diferencia de T_m entre ADN libre y complejo	Posibilita estudios termodinámicos y cinéticos.	Con registro espectrofotométrico de la fusión del ADN es un problema que el compuesto emita a 260 nm.
Electroforesis (en gel y capilar, CE) Diferencia de migración del ADN libre y el complejo dentro de un campo eléctrico	Permite separar el ADN libre y el complejo. La electroforesis en gel es una técnica de uso muy extendido y común y no requiere equipos específicos.	No determina el modo de interacción. Alto consumo de reactivos, incluso en CE (inyección y/o llenado). CE requiere instrumentación costosa y compuestos con carga positiva se adhieren al capilar.
Footprinting Protección frente a ataque enzimático o químico en el ADN por la unión de un ligando a esa secuencia.	Resolución alta. Permite determinar la secuencia preferente de unión, al secuenciar el fragmento protegido del corte.	Laborioso. Requiere radiactividad. Sensibilidad media.

TÉCNICA y su BASE FÍSICO-QUÍMICA	VENTAJAS	INCONVENIENTES
Cromatografía Separación de moléculas libres y complejos por diferente interacción con las fases cromatográficas (móvil y estacionaria). Diferentes tipos: adsorción, partición, intercambio iónico, exclusión o afinidad.	Es posible recoger las muestras separadas y realizar un análisis cuantitativo de la cinética de la unión [173].	Equipamiento complejo y costoso. Volúmenes elevados. Aplicabilidad limitada.
Espectrometría de masas Distinto comportamiento según la relación masa-carga (ej: tiempo de vuelo, TOF)	Gran exactitud, resolución y rapidez en el análisis. Puede combinarse con CE o HPLC	Alto consumo de reactivos. Instrumentación costosa.
Resonancia Magnética Nuclear Diferente comportamiento al aplicar un campo magnético a los núcleos atómicos con propiedades magnéticas, según su entorno.	Muy alta resolución. Información sobre el tipo y grado de interacción. Permite determinar la estructura molecular del complejo.	Baja sensibilidad. Muy alto consumo de ADN y ligando. Requiere instrumentación costosa y mucha experiencia en su uso.
Resonancia de plasmón de superficie Cambios en el índice de refracción superficial del complejo	Posibilita estudios cualitativos y cuantitativos de interacciones tan diversas como ADN-proteína o ARN-ligando de bajo peso molecular. No requiere ningún marcaje externo y las lecturas se hacen en tiempo real.	Requiere instrumentación costosa. Elevado gasto de analito [212]. La sensibilidad depende directamente de la masa molecular del ligando [183].

TÉCNICA y su BASE FÍSICO-QUÍMICA	VENTAJAS	INCONVENIENTES
Técnicas de microscopía Observación directa del complejo. Ej.: microscopía electrónica de transmisión, de barrido, de efecto tunel y de fuerza atómica.	Permite trabajar con muestras en vacío, en disolución o en aire y a temperaturas altas o criogénicas [213].	Requiere instrumentación costosa y poco habitual.
Difracción de rayos X Análisis de mapas de difracción de cristales de complejos ADN-ligando.	Caracterización estructural con alta resolución (menos de 3 Å). Alto número de estructuras resueltas [214].	Protocolo laborioso. La muestra debe estar formando cristales tridimensionales. Baja sensibilidad. Instrumentación costosa. Requiere mucha experiencia.
Métodos teóricos/Simulaciones Estimación de datos energéticos. Destacan las minimizaciones de energía (ME), las simulaciones de dinámica molecular (MD), las de Monte Carlo (MC) y las perturbaciones de la energía libre (PEL).	Predicción <i>in silico</i> de numerosas variables de la interacción (energías, cambios conformacionales, etc.).	Deben estar apoyados en datos experimentales.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD Y MODO DE UNIÓN AL ADN

1.1. Ensayo de relajación de plásmido en gel de agarosa [215]

El ADN plasmídico se extrae usando el sistema *Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System* (Promega), siguiendo las instrucciones recomendadas. Habitualmente se parte de 200 ml de cultivo en fase exponencial de *Escherichia coli* DH5 α , que porta el vector plasmídico pBluescript SK+ (Stratagene). El crecimiento bacteriano se lleva a cabo a 37°C en medio Luria-Bertani (LB) [10 g Bacto-triptona (Difco 0123-01-1), 5 g de extracto de bacteria y levadura (Difco 0127-05-3), 10 g NaCl y agua destilada hasta 1 litro] suplementado con 100 mg/ml de ampicilina.

Cada mezcla de reacción, con un volumen de 6 μ l, contiene 200 ng de ADN plasmídico bacteriano (pBluescript SK+, Stratagene, 2961 pb, concentración final $5.12 \cdot 10^{-5}$ M pb) en TAE 2X (80 mM Tris-acetato, 2 mM EDTA, pH 7.5 [216]), 5% glicerol, más el compuesto en estudio a la concentración que corresponda en cada caso.

Estas mezclas completas se incuban durante 1 hora a 37°C antes de la electroforesis, que se lleva a cabo en TAE 1X [216], gel de agarosa al 1%, a 60V (4.7 V/cm, 100 mA) durante una hora.

Los geles se tiñen durante diez minutos en bromuro de etidio 5 μ g/ml para poder ver después el ADN mediante un transiluminador ultravioleta.

1.2. Análisis electroforético de plásmido superenrollado y relajado

El análisis completo implica dos geles de agarosa y muestras de 24 μ l de cuatro mezclas. Cada mezcla contiene 800 ng de ADN plasmídico bacteriano (pBluescript SK+, Stratagene), glicerol 5% y TAE 2X. Las mezclas 1 y 3 se preparan con plásmido superenrollado sin tratar, mientras que las mezclas 2 y 4 se preparan con plásmido relajado y covalentemente cerrado, obtenido por tratamiento con topoisomerasa-I como se detalla abajo.

Finalmente, se añade a las mezclas 3 y 4 el compuesto bajo estudio en una concentración de 0.1 mM y se incuba 1 hora a 37°C antes de la electroforesis.

Uno de los dos geles de agarosa contiene compuesto bajo estudio en la masa del gel a una concentración final de 0.01 mM.

Se lleva a cabo la electroforesis en TAE 1X y a 60V durante 1 h (4.7 V/cm, 100 mA) de muestras de 6 µl de cada mezcla en dos geles independientes de agarosa al 1%. Ambos geles se tiñen tras la electroforesis con 5 µg/ml de bromuro de etidio y se visualizan usando un transiluminador UV.

El plásmido relajado y covalentemente cerrado se obtiene por tratamiento con topoisomerasa-I. La mezcla de reacción contiene entre 4 y 5 µg plásmido, 20 µl tampón 10X suministrado por el proveedor del enzima, 20 µl BSA al 0,1%, agua ultrapura milliQ hasta un volumen final de 200 µl y 10 unidades de topoisomerasa-I (TaKaRa). La mezcla se reparte en dos tubos y se incuban a 37°C durante tres horas. La preparación se limpia de proteínas mediante extracción con fenol/cloroformo [217], seguida de precipitación con etanol y resuspensión en tampón TE.

2. OLIGONUCLEÓTIDOS

Se han utilizado oligonucleótidos sintetizados a escala 0,2 µmol o 1 µmol y purificados por HPLC (MWG-Biotech). Las secuencias, que se muestran en la tabla 6, han sido diseñadas computacionalmente mediante un programa desarrollado en nuestro grupo.

La mayoría de estos oligonucleótidos están marcados por 6-carboxi-fluoresceína (FAM) en 5' y por tetrametilrodamina (TAMRA) en 3' (figura 22). En el ensayo, descrito más adelante, FAM actúa como fluoróforo y TAMRA como amortiguador de fluorescencia.

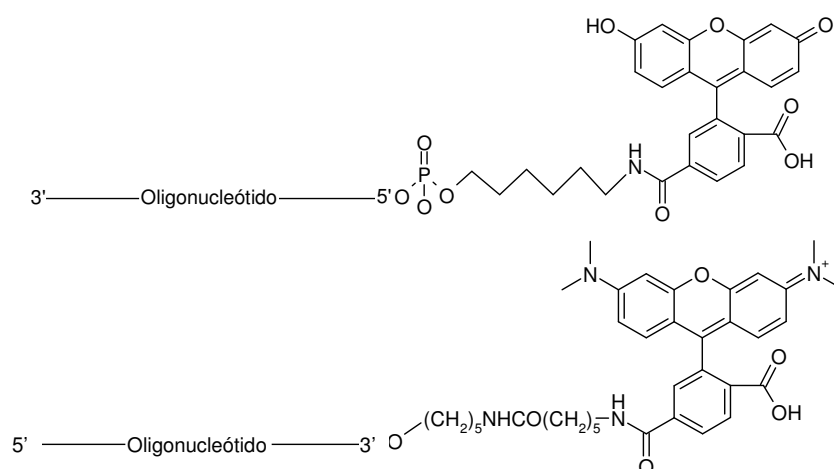


Figura 22. Estructura general de los oligonucleótidos marcados. Arriba: oligonucleótido marcado con FAM. Abajo: oligonucleótido marcado con TAMRA

Tabla 6. A: Secuencia completa de los oligonucleótidos tipo AT usados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (F = FAM; T = TAMRA)	Modificación	Bases
AT4	5' -CAATTAAATATAAC-3'	-	14
AT-F	5' -F-CAATTAAATATAAC-3'	5'FAM	14
AT-T	3' -T-GTTAATTTATATTG-5'	3'TAMRA	14
AgC-F	5' -F-AATATAAAGCAAATTA-3'	5'FAM	17
AgC-T	3' -T-TTATATTTCTTTAATT-5'	3'TAMRA	17
Tgg-F	5' -F-AATATAAACCAAATTA-3'	5'FAM	17
Tgg-T	3' -T-TTATATTTGGTTTAATT-5'	3'TAMRA	17
Tgg2d-F	5' -F-AATATAAACCAACCAAATTA-3'	5'FAM	20
Tgg2d-T	3' -T-TTATATTTGGTGGTTTAATT-5'	3'TAMRA	20
Tgg2r-F	5' -F-AATATAAACCATGGAAATTA-3'	5'FAM	21
Tgg2r-T	3' -T-TTATATTTGGTACCTTTAATT-5'	3'TAMRA	21
AgA-F	5' -F-AATATAAAGAAATTA-3'	5'FAM	16
AgA-T	3' -T-TTATATTTCTTTAATT-5'	3'TAMRA	16
CgA-F	5' -F-AATATAAACGAAATTA-3'	5'FAM	17
CgA-T	3' -T-TTATATTTGCTTTAATT-5'	3'TAMRA	17
Agc2d-F	5' -F-AATATAAAGCAGCAAATTA-3'	5'FAM	20
Agc2d-T	3' -T-TTATATTTCGTCGTTTAATT-5'	3'TAMRA	20
Agc2r-F	5' -F-AATATAAAGCGCTAAATTA-3'	5'FAM	20
Agc2r-T	3' -T-TTATATTTCGCGATTTAATT-5'	3'TAMRA	20
ggC-F	5' -F-AATATAAAGGCAAATTA-3'	5'FAM	18
ggC-T	3' -T-TTATATTTCCGTTTAATT-5'	3'TAMRA	18
Cgg-F	5' -F-AATATAAACGGAAATTA-3'	5'FAM	18
Cgg-T	3' -T-TTATATTTGCCTTTAATT-5'	3'TAMRA	18
CggCgg-F	5' -F-AATATAAACGCGCGAAATTA-3'	5'FAM	21
CggCgg-T	3' -T-TTATATTTGCCGCCTTTAATT-5'	3'TAMRA	21
CCgCgg-F	5' -F-AATATAAACCGCGGAAATTA-3'	5'FAM	21
CCgCgg-T	3' -T-TTATATTTGGCGCCTTTAATT-5'	3'TAMRA	21
ACgT-F	5' -F-AATATAAAACGTTAAATTA-3'	5'FAM	20
ACgT-T	3' -T-TTATATTTTGCAATTTAATT-5'	3'TAMRA	20
TCgA-F	5' -F-AATATAAATCGATAATTA-3'	5'FAM	20
TCgA-T	3' -T-TTATATTTAGCTATTTAATT-5'	3'TAMRA	20
CCgg-F	5' -F-AATATAAACCGGTAAATTA-3'	5'FAM	20
CCgg-T	3' -T-TTATATTTGGCCATTTAATT-5'	3'TAMRA	20
gCgg-F	5' -F-AATATAAAGCGGTAAATTA-3'	5'FAM	20
gCgg-T	3' -T-TTATATTTCGCCATTTAATT-5'	3'TAMRA	20
gCgT-F	5' -F-AATATAAAGCGTTAAATTA-3'	5'FAM	20
gCgT-T	3' -T-TTATATTTCGCAATTTAATT-5'	3'TAMRA	20
2SS-F	5' -F-AATATACGTAATATCGATTAA-3'	5'FAM	21
2SS-T	3' -T-TTATATGCATTATAGCTAATT-5'	3'TAMRA	21
2SJ-F	5' -F-AATATACGTTTCGATTAA-3'	5'FAM	17
2SJ-T	3' -T-TTATATGCAAGCTAATT-5'	3'TAMRA	17
TggCCA-F	5' -F-AATATAAATGGCCAAATTA-3'	5'FAM	20
TggCCA-T	3' -T-TTATATTTACCGGTTTAATT-5'	3'TAMRA	20
TggAATgg-F	5' -F-AATATAAATGGTTTGAATTA-3'	5'FAM	22
TggAATgg-T	3' -T-TTATATTTACCAAACCTTAATT-5'	3'TAMRA	22
AgA2-F	5' -F-AATATAAAGAAGAAATTA-3'	5'FAM	19
AgA2-T	3' -T-TTATATTTCTTCTTTAATT-5'	3'TAMRA	19

Tabla 6. B: Secuencia completa de los oligonucleótidos tipo GC empleados.

Nombre	Secuencia (F = FAM; T = TAMRA)	Modificación	Bases
GC4	5' - GCGCGGCGTCCGGGCC -3'	-	16
GC-F	5' - F -GCGCGGCGTCCGGGCC-3'	5'FAM	16
GC-T	3' - T -CGCGCCGCAGGCCCGG-5'	3'TAMRA	16
CTAg-F	5' - F -GCGCGGCGCTAGCCGGGCC-3'	5'FAM	19
CTAg-T	3' - T -CGCGCCGCGATCGGCCCGG-5'	3'TAMRA	19
gTAC-F	5' - F -GCGCGGCGTACCGGGGCC-3'	5'FAM	17
gTAC-T	3' - T -CGCGCCGCATGGCCCGG-5'	3'TAMRA	17
gATC-F	5' - F -GCGCGGCGATCCGGGCC-3'	5'FAM	17
gATC-T	3' - T -CGCGCCGCTAGGCCCGG-5'	3'TAMRA	17
TATA-F	5' - F -GCGCGGCTATACGGGCC-3'	5'FAM	17
TATA-T	3' - T -CGCGCCGATATGCCCGG-5'	3'TAMRA	17
AATT-F	5' - F -GCGCGGCAATTCGGGCC-3'	5'FAM	17
AATT-T	3' - T -CGCGCCGTAAAGCCCGG-5'	3'TAMRA	17
(Mal)ATAT-F	5' - F -GGCCCGGATATCCGCGC-3'	5'FAM	17
ATAT-T	3' - T -CCGGGCCTATAGGCGCG-5'	3'TAMRA	17
bATAT-F	5' - F -GCGCGGCATATCGGGGCC-3'	5'FAM	17
TTAA-F	5' - F -GCGCGGCTTAACGGGCC-3'	5'FAM	17
TTAA-T	3' - T -CGCGCCGAATTGCCCGG-5'	3'TAMRA	17

2. 1. Diseño computacional de las secuencias

Para el diseño de las secuencias de oligonucleótidos se ha empleado la herramienta informática *DNAword*. Se trata de una aplicación VBA (*Visual Basic for Applications*) desarrollada en nuestro laboratorio y que corre en Microsoft Word. Este software esta constituido por diversos módulos (*SeqPack*, “Calcula secuencias”, “Traduce códigos”, “Duplicados y malos apareamientos” (o *Mispairing*) y “Visualizar malos apareamientos” (o *CleanUp*)) que facilitan la realización de diversas tareas.

El módulo *SeqPack* busca todas las secuencias posibles que contienen un conjunto dado de subsecuencias. Los comandos que se deben escribir para ejecutar este módulo tienen que contener instrucciones sobre las subsecuencias que deben estar incluidas y aquellas que no deben estar presentes en el oligonucleótido. De la misma manera, se puede orientar la búsqueda hacia secuencias auto-complementarias ya sean de cadena sencilla o de cadena doble. Este módulo emplea un algoritmo numérico rápido que posibilita la exploración de todas las secuencias posibles con una longitud razonable para oligonucleótidos sintéticos. El principal objetivo del algoritmo es encontrar las secuencias más cortas que cumplen los requisitos especificados.

Por ejemplo, la búsqueda de los oligonucleótidos no complementarios más cortos que contengan todas las dieciséis posibles subsecuencias de cuatro bases formadas por los pares G y C (o A y T) genera doce pares complementarios de una longitud de trece bases. El tiempo de búsqueda es de aproximadamente medio segundo. De esta manera se diseñaron los oligonucleótidos AT4 y GC4 (en adelante AT y GC).

El módulo *CleanUp* toma directamente los datos de salida de *SeqPack* y localiza y elimina los pares duplicados. Además, identifica el peor apareamiento no deseado que puede producirse para cada par de secuencias, dándole una puntuación que utiliza un índice cualitativo que resulta de la suma de un punto para cada mal apareamiento, dando mayor peso a los consecutivos asignándoles un valor de un punto más un número de puntos igual a la posición que ocupe cada mal apareamiento dentro del grupo de apareamientos consecutivos. Los resultados se presentan en orden en función de esa puntuación, de forma que las mejores secuencias posibles aparecen en primer lugar, incluyendo la puntuación e información gráfica de los peores apareamientos para cada par.

El módulo *Mispairing* permite una exploración manual de todas las posibles asociaciones no deseadas para cada conjunto de secuencias. Puede ser útil, por ejemplo, para romper una elevada acumulación de GCs y así disminuir la temperatura de fusión.

El objetivo conjunto de los tres módulos es facilitar la selección de las secuencias que cumplen con todos los requerimientos impuestos en el primero y que muestren la menor probabilidad de asociarse de forma incorrecta.

2.2. Preasociación de oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos son adquiridos en forma de cadena sencilla y deben asociarse antes de su uso. La reacción de asociación de cada oligonucleótido y su complementario se realiza en tampón TAE 2X (0,08 M Tris-Acetato, 2 mM EDTA) o en fosfato potásico 20 mM, a pH 7,5. Para conseguir un descenso gradual de temperatura se utiliza un termociclador PTC-100 de MJ-Research con un programa que consta de un primer ciclo de 5 minutos a 95°C y 76 ciclos sucesivos de 45 segundos en los cuales va disminuyendo la temperatura un grado por ciclo hasta alcanzar 20°C.

3. PREFERENCIA O ESPECIFICIDAD DE SECUENCIA

Los métodos que se presentan a continuación son un resultado en sí mismos, ya sea de forma parcial o en sus aplicaciones. Se presentan aquí sus aspectos más generales y puramente metodológicos.

3.1. Procedimientos basados en electroforesis capilar para la determinación de la preferencia de unión de ligandos al ADN

En este procedimiento se utilizan compuestos intercalantes comerciales cuya especificidad de secuencia parece estar bien establecida gracias a otros métodos. De este modo se verifica la validez del método basado en electroforesis capilar. En principio se utiliza bromuro de etidio y ADN comercial de secuencia conocida. En concreto, se utilizan los oligonucleótidos AT4 y GC4, cuya secuencia se especifica en la tabla 6 y que contienen, respectivamente, sólo las bases adenina (A) y timina (T), o bien únicamente guanina (G) y citosina (C).

El equipo de electroforesis capilar utilizado es el *Agilent 3D CE Capillary electrophoresis System*, de Agilent Technologies, que incluye una lámpara de deuterio (UV) y usa como detector un diodo *array*. La lectura se realiza a 260 nm. Se emplea un tubo capilar de sílice fundida con un diámetro interno de 75 µm y 58,5 cm de longitud total (50 cm de longitud efectiva). Para acondicionar este capilar previamente a su primer uso se hace pasar por su interior NaOH 1M durante una hora. Al principio y al final del día se acondiciona el tubo capilar inyectando primero agua milliQ (15-30 minutos), después NaOH 0,1M (30-60 minutos) y seguidamente, agua milliQ de nuevo (otros 15-30 minutos).

Como medio de separación para la electroforesis se emplea un tampón que se mantenga a un pH próximo a la neutralidad (7,5) para asegurar el mantenimiento de la estructura en doble hélice del ADN. En principio se usa TAE 1X (0,04 M Tris-Acetato, 1 mM EDTA), que contiene Tris como agente tamponante, acetato como contraión y EDTA como agente quelante. Se prueba también el uso de tampón fosfato y/o Tris-Borato-EDTA. La temperatura se mantiene siempre muy próxima a 25 °C.

Todos los tampones y las muestras se disuelven en agua milliQ (*Millipore*, Bedford, MA, USA), filtradas con filtros de 0,2 μm de diámetro de poro y posteriormente se sonicán para su desgasificación.

Se determina, bajo ausencia de flujo electro-osmótico (FEO) causada por la adición al tampón de separación de 0,5% metilhidroxietil-celulosa (MHEC), la movilidad electroforética de los complejos formados por el cromóforo (a diferentes concentraciones) con las secuencias AT o GC. Durante la electroforesis se dan unas condiciones de equilibrio entre el estado unido y el dissociado y se va a poder derivar información de gran utilidad sobre el grado de unión, en función de la concentración de ligando, a partir de la movilidad electroforética del complejo. Para ello, se hace pasar tampón por el capilar y seguidamente, se le rellena de una concentración determinada de intercalante. A continuación se inyecta la muestra en tampón, es decir, únicamente el oligonucleótido (a una concentración máxima de 20 μM) o junto con la misma concentración de intercalante que la del capilar.

En todos los casos la forma de inyección empleada es la hidrodinámica, variando según el método empleado entre 10, 30 ó 50 mbar durante 3, 5, 10 ó 15. Finalmente, la inyección que se optimizó fue de 50 mbar·5 s. Posteriormente se aplica presión para conseguir el vaciado del capilar y poder detectar el consecuente cambio en el electroferograma.

El potencial aplicado, según el método utilizado, es de -15, -20 ó -25 kV.

3.2. Método de determinación de preferencia de secuencia y afinidad en la unión de ligandos al ADN basado en curvas de disociación térmica de ADN

Se utilizan los oligonucleótidos diseñados computacionalmente y marcados por 6-carboxi-fluoresceína (FAM, que actúa como fluoróforo) en 5' y por tetrametilrodamina (TAMRA, que actúa como amortiguador de fluorescencia o *quencher*) en 3'. Para ello, se asocian empleando el protocolo antes mencionado.

En la estructura del ADN de cadena doble el fluoróforo y el *quencher* están muy próximos y la fluorescencia está extinguida [218]. Cuando la doble hélice se desnaturaliza por calor, el fluoróforo y el *quencher* se separan y se produce un gran aumento en la fluorescencia [219].

La presencia de ligando en el medio contribuye al incremento en la temperatura a la que la mitad de las moléculas de ADN se han disociado [200, 220] (T_m), quedando las cadenas separadas y aumentando así la fluorescencia. Por tanto, se llevan a cabo curvas de disociación térmica del ADN en presencia de diferentes concentraciones del ligando en estudio (entre 10^{-2} y 10^{-9} M).

Ensayo en placas multipocillo

En cada uno de los 96 pocillos de las placas utilizadas se lleva a cabo una reacción de disociación y asociación independiente. Para ello, en cada pocillo se prepara una mezcla de oligonucleótido marcado y asociado, con una concentración de 10^{-7} M y diferentes concentraciones de ligando, que oscilan entre 10^{-2} y 10^{-9} M. Se emplean mezclas de reacción con un volumen total de 20 μ l. Estas mezclas se someten a una incubación de duración y temperatura optimizadas según la naturaleza del ligando en estudio, habiéndose establecido incubaciones de una hora a 37°C para los intercalantes y un día a 25°C para los compuestos que presentan unión covalente al ADN.

Curvas de disociación y asociación

La lectura de la fluorescencia emitida a cada grado de temperatura de los protocolos de disociación y asociación se lleva a cabo en un termociclador de tiempo real, que funciona como un espectrofluorímetro en el que se puede fijar una variación constante de la temperatura y que permite el estudio de 96 muestras en paralelo con un volumen total de 20 μ l por mezcla de reacción o pocillo, mediante un programa diseñado por nosotros ya que el *software* del equipo (*7500 Sequence Detection System*) no permite el uso de un programa prediseñado con un rango suficientemente amplio de temperaturas. Se han empleado los termocicladores *7000 Real Time PCR System* y *Fast-7500 Real time PCR System*, ambos de ABI-PRISM.

Programa de disociación: se utilizan dos programas diferentes, según el número de A/T de las secuencias empleadas en la placa. Constan de un primer ciclo de cinco minutos a 10 (para secuencias con gran porcentaje A/T) ó 20 °C, y 74 ciclos sucesivos en los que la temperatura aumenta un grado por cada ciclo (de 45 segundos cada uno) hasta alcanzar 94 °C.

Programa de asociación: primer ciclo de cinco minutos a 94 °C y 74 ciclos sucesivos en los que la temperatura disminuye un grado por cada ciclo (de 45 segundos) hasta alcanzar 20 °C.

Análisis de los datos

Para el análisis de los datos obtenidos en la disociación y asociación de los oligonucleótidos marcados expuestos a diferentes concentraciones de ligando se requiere el empleo de herramientas de software basadas en Microsoft Excel que han sido desarrolladas en el laboratorio.

El primer tratamiento numérico necesario es una *reducción del ruido* de las curvas. La aplicación desarrollada en el grupo realiza una operación adaptativa usando un filtro triangular, que es un equivalente en una dimensión del filtro de Bartlett [221, 222]. Se trata de un “*kernel*” o matriz de convolución de perfil triangular que se puede definir por la altura. Por ejemplo, el kernel para un filtro de altura 3 sería [1:2:3:2:1]/9. La aplicación calcula de manera automática la altura óptima para cada serie de datos. El resultado de este complejo algoritmo resulta muy satisfactorio con este tipo de datos, puesto que la optimización automática se basa en localizar un “hueco” en el dominio de frecuencias y luego atenuar fuertemente todas las frecuencias por encima de este valor, mientras que mantiene inalteradas las frecuencias menores.

A causa de muy diversos motivos, el rango de valores de intensidad de fluorescencia varía entre los distintos pocillos de una placa, por lo que se han empleado diversos métodos de *normalización*. Además, el rendimiento cuántico del cromóforo FAM disminuye de manera inversamente proporcional a la temperatura [218, 223]. Como consecuencia de esto, tanto el fondo inferior como superior, asíntotas de la curva sigmoidea de disociación-asociación, son también función de la temperatura.

En ocasiones, es suficiente para corregir esto una simple normalización lineal de los valores de intensidad de fluorescencia para cada curva, transformando el mínimo y el máximo experimental en 0 y 1, respectivamente.

$$F_{[0,1]}(T) = \frac{F(T) - F_{\min}}{F_{\max} - F_{\min}}$$

En esta expresión, F_{\min} y F_{\max} representan los valores experimentales de fluorescencia mínimo y máximo respectivamente, $F(T)$ es la intensidad de fluorescencia experimental a la temperatura T y $F_{[0,1]}(T)$ es el valor de intensidad de fluorescencia a la temperatura T normalizada al intervalo $[0,1]$. Esta es una aproximación muy sencilla, pero en algunos casos no se puede aplicar, como por ejemplo en el análisis de curvas de fusión bifásicas. La alternativa en estos casos es una eliminación completa de los fondos, la cual conlleva una normalización $[0,1]$ y que cumple la siguiente relación:

$$F_{[0,1]}(T) = \frac{F(T) - L(T)}{U(T) - L(T)}$$

En esta expresión, $L(T)$ y $U(T)$ son, respectivamente, los valores del *fondo superior e inferior* a temperatura T . En algunos casos estos valores pueden ser obtenidos de forma experimental. Otra alternativa es el empleo de funciones lineales. La aplicación MELT contiene un módulo mediante el cual se lleva a cabo esta corrección de forma casi automática haciendo una razonable estimación inicial que es posteriormente ajustada de forma manual para cada serie de datos.

Una vez normalizadas las curvas al intervalo $[0,1]$ por cualquiera de los métodos anteriores, la T_M se calcula como la temperatura a la que la intensidad relativa de fluorescencia alcanza un valor de 0,5. Usualmente este valor no corresponde exactamente con ningún punto experimental y se obtiene por interpolación lineal usando los valores experimentales inferior y superior más próximos.

En algunos casos, las curvas de disociación obtenidas son bifásicas. Para su análisis se utiliza otro módulo que estudia todo un experimento de titulación (del inglés *titration*), que generalmente son doce reacciones independientes de disociación. De forma interactiva, se identifican las series de datos (curvas) que sirven como modelo de fase 1 pura y de fase 2 pura, en adelante $F_1(T)$ y $F_2(T)$. Normalmente, la primera coincide con la curva de disociación de la mezcla con ADN libre y la segunda, con la que presenta mayor concentración de ligando. Cuando es necesario, alguna o ambas curvas son sustituidas por otras curvas de disociación genéricas, ya que lo que realmente se requiere es la forma geométrica general.

Para cada curva experimental, $F_i(T)$, el programa procede de forma automática. Las series de datos $F_1(T)$ y $F_2(T)$ son transformadas linealmente en ambos ejes siguiendo las ecuaciones

$$F_1^*(T) = F_1(m_1 \cdot T + b_1) \cdot h_1$$

$$F_2^*(T) = F_2(m_2 \cdot T + b_2) \cdot h_2$$

En el eje vertical, la ordenada en el origen de la transformación lineal es cero puesto que la intensidad de fluorescencia relativa se corrige previamente dentro del intervalo [0,1] mediante la herramienta de eliminación de fondos expuesta anteriormente. La pendiente de esta transformación lineal, $h_{(1,2)}$ se comporta como un factor de escala vertical. La transformación lineal en el eje horizontal está representada por la expresión $m_{(1,2)} \cdot T + b_{(1,2)}$. La pendiente, $m_{(1,2)}$, produce una compresión o extensión horizontal y la ordenada en el origen, $b_{(1,2)}$, produce un desplazamiento lateral de la curva. Una vez transformadas, las series de datos $F_1^*(T)$ y $F_2^*(T)$, son recalculadas por interpolación lineal con los valores experimentales de temperatura. La suma de las dos series de datos transformadas genera una curva bifásica, $F^*(T)$:

$$F^*(T) = F_1^*(T) + F_2^*(T)$$

A continuación, se usa el acceso programático al módulo Solver de Excel para conseguir ajustar esta curva $F^*(T)$ con la serie de datos experimentales, variando para ello los cinco parámetros m_1 , m_2 , b_1 , b_2 y únicamente h_1 , ya que se impone la condición de que $h_2 = 1 - h_1$. Tras este ajuste, h_1 y h_2 representan la fracción molar de moléculas ADN correspondientes a la fase 1 y a la fase 2, respectivamente. Entonces, la contribución de cada fase en la serie de datos experimentales, $F_i(T)$, se elimina por sustracción de sus respectivos componentes una vez ajustados, $F_1^*(T)$ o $F_2^*(T)$:

$$F_{i, fase 1}(T) = F_i(T) - F_2^*(T) = F_i(T) - F_2(m_2 \cdot T + b_2) \cdot h_2$$

$$F_{i, fase 2}(T) = F_i(T) - F_1^*(T) = F_i(T) - F_1(m_1 \cdot T + b_1) \cdot h_1$$

El resultado final de este tratamiento de los datos son dos series de datos de curvas de disociación puramente monofásicas. Estas curvas son procesadas para poder extraer y representar gráficamente, por un lado, el incremento de temperatura de disociación, ΔT_M , frente a la concentración ligando y por otra parte, las series de fracción molar de fase 1 y la recíproca fase 2, también frente a la concentración de ligando. Esta última se procesa automáticamente para calcular la concentración de ligando (C_{50}) necesaria para producir la mitad del efecto máximo, esto es, una fracción molar de la fase 1 igual a fase 2, igual a 0,5.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. PROCEDIMIENTOS BASADOS EN ELECTROFORESIS CAPILAR PARA LA DETERMINACIÓN DE LA PREFERENCIA DE UNIÓN DE LIGANDOS AL ADN

Con este trabajo se pretende caracterizar la unión entre determinados cromóforos catiónicos que se unen al ADN por intercalación. El complejo formado por el ligando y el ADN tendrá una migración más lenta a lo largo del tubo capilar, lo que posibilita la detección de su formación. Por otra parte, al comparar las diferencias de migración producidas con un mismo compuesto y distintas secuencias, se puede establecer un orden de afinidad.

En un principio se intentó desarrollar un procedimiento que permitiera llevar a cabo este mismo estudio en geles horizontales de agarosa, pero se desechó, entre otras causas, por su laboriosidad y difícil aplicabilidad para un elevado número de compuestos. Por ello, se buscó adaptarlo a electroforesis capilar, una técnica con el mismo fundamento pero menor gasto potencial de reactivos y una mayor capacidad de automatización.

A modo de ejemplo se muestran los resultados obtenidos con el mono-intercalante bromuro de etidio al interaccionar con los oligonucleótidos AT (AT4) y GC (GC4). En este procedimiento se utilizan compuestos intercalantes comerciales cuya especificidad de secuencia parece estar bien establecida gracias a otros métodos. De este modo se verifica la validez del procedimiento basado en electroforesis capilar.

Se requiere un tampón que se mantenga a un pH próximo a la neutralidad para asegurar el mantenimiento de la estructura en doble hélice del ADN. Se realizan pruebas con TAE 1X (que contiene Tris como agente tamponante, acetato como contraión y EDTA como agente quelante) y TBE 0,5X (Tris-Borato-EDTA), ambos a pH=7,5 y finalmente se emplea TAE 1X, ya que con él se obtiene una mejor línea de base. En principio se añadía 0,5 g/l de metilhidroxietil-celulosa al tampón para la eliminación del flujo electro-osmótico (FEO, movimiento de líquido en el capilar de sílice fundida originado por la carga eléctrica negativa existente en los grupos silanoles que se ionizan en el interior del tubo capilar, que atraen a las especies con carga positiva del tampón, ocasionando que con su migración hacia el cátodo arrastren al resto del fluido). Todos los analitos se diluyen en el tampón, de manera que no se alteren ni la corriente ni el FEO con la entrada en el capilar de cualquiera de ellos.

Se evaluaron dos estrategias diferentes para abordar este estudio:

1. Llenado del capilar con el compuesto en estudio (bromuro de etidio) y posterior inyección del ADN (AT o GC) previamente incubado una hora a 37 °C con el mismo ligando. De esta manera se produce la interacción a lo largo de todo el recorrido del tubo. En los viales de salida y entrada habrá bromuro de etidio a la misma concentración que en el interior del capilar.

Esta estrategia se desestimó por varios motivos. En primer lugar, por el elevado consumo de ligando. Por otra parte, el intercalante (cargado positivamente) sufre una adsorción progresiva al interior del capilar de sílice, lo cual dificulta el acondicionamiento del capilar e influye negativamente en la reproducibilidad de los resultados.

2. Inyección hidrodinámica (por presión) del ADN tras incubarlo una hora a 37 °C con el intercalante. En este caso el capilar sólo contiene tampón. Se aplica un potencial de -20 kV. A continuación de la inyección de muestra se introduce tampón fresco por presión.

El espectro (de 220 a 600 nm) de los picos obtenidos en todos los electroferogramas es un dato relevante de cara a distinguir compuestos (ver figura 23). Incluso permite diferenciar secuencias, pudiendo así inyectar a la vez un oligonucleótido AT y un GC, que se diferencian además por su movilidad.

El flujo electro-osmótico hace que los oligonucleótidos se muevan hacia el polo negativo o cátodo ya que dicho flujo es mayor que la propia migración electroforética de los oligonucleótidos. En las condiciones empleadas, migra más el oligonucleótido AT que GC (ver electroferograma 1). Con la formación del complejo ADN-ligando aumentan tanto la migración como la separación entre los picos de AT y GC (electroferograma 2). A la vista de los resultados obtenidos, a concentraciones no saturantes de bromuro de etidio hay un ligero aumento en la migración de AT y una ligera disminución en la de GC (electroferograma 3). A concentraciones elevadas de ligando aparece un pico que presenta la mayor migración y corresponde al ligando libre (con λ_{em} máxima a 288 nm), es decir, que no forma parte del complejo con el ADN.

Además, se puede observar un cambio en la morfología del pico por la intercalación del ligando en el ADN; así, se produce una bajada en la altura y un ensanchamiento, aunque el área se mantiene prácticamente constante.

No se profundizó más en el estudio ya que se determinó que las cantidades y concentraciones de reactivos (tanto ADN como ligando) requeridas, son demasiado elevadas. Se emplean: 40 μ l de oligonucleótido 20 μ M por microvial (para un máximo de dos inyecciones por microvial) y bromuro de etidio de 10^{-1} a 10^{-4} mM (mínimo 300 μ l por vial). Además, se hicieron ensayos con el plásmido pBluescript SK+, consumiéndose de 10 a 14 μ g por microvial.

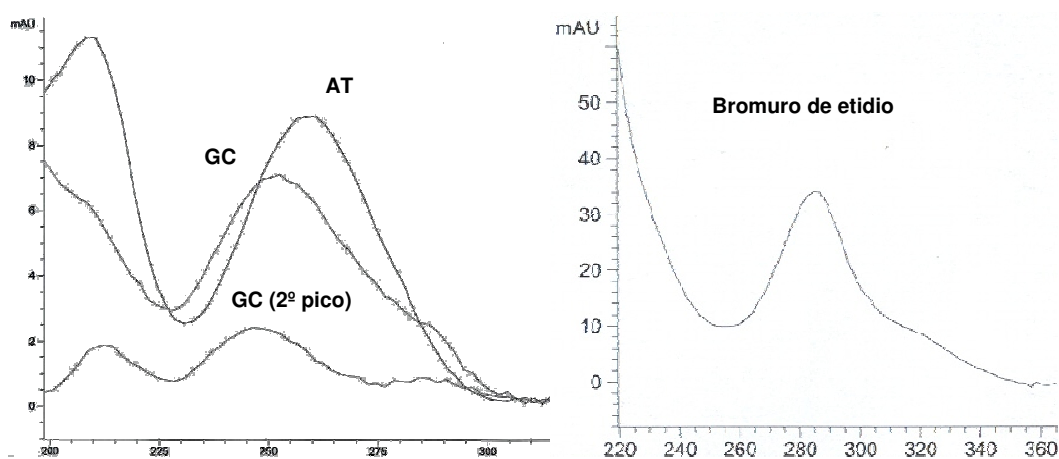
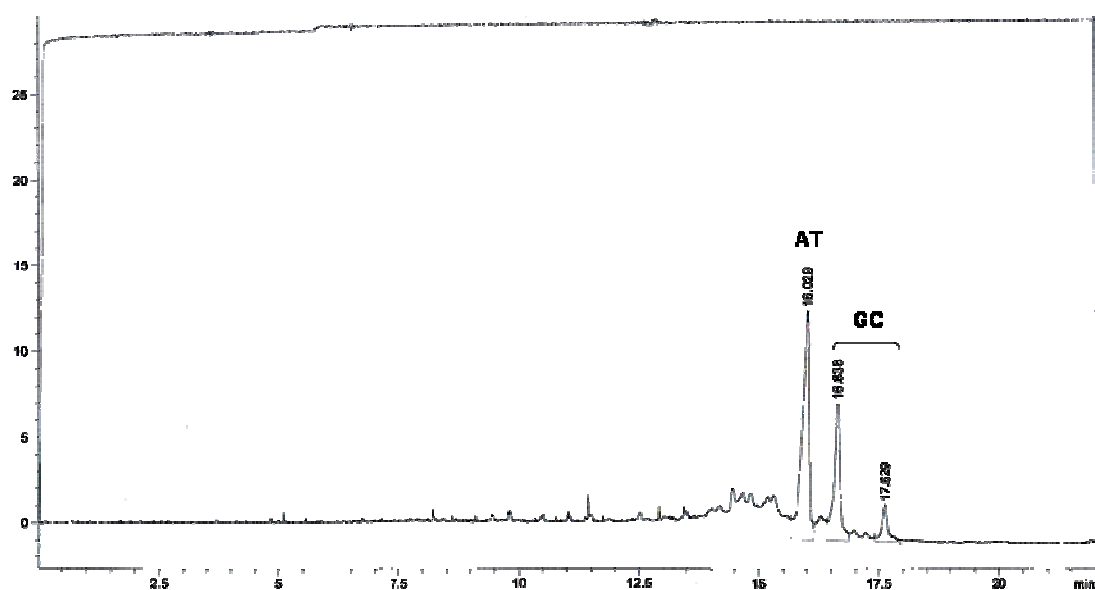
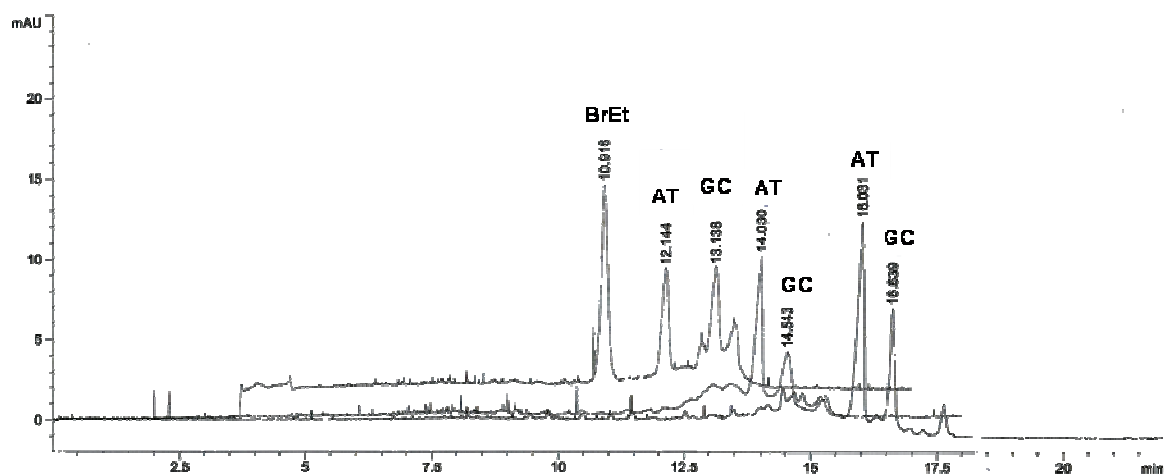


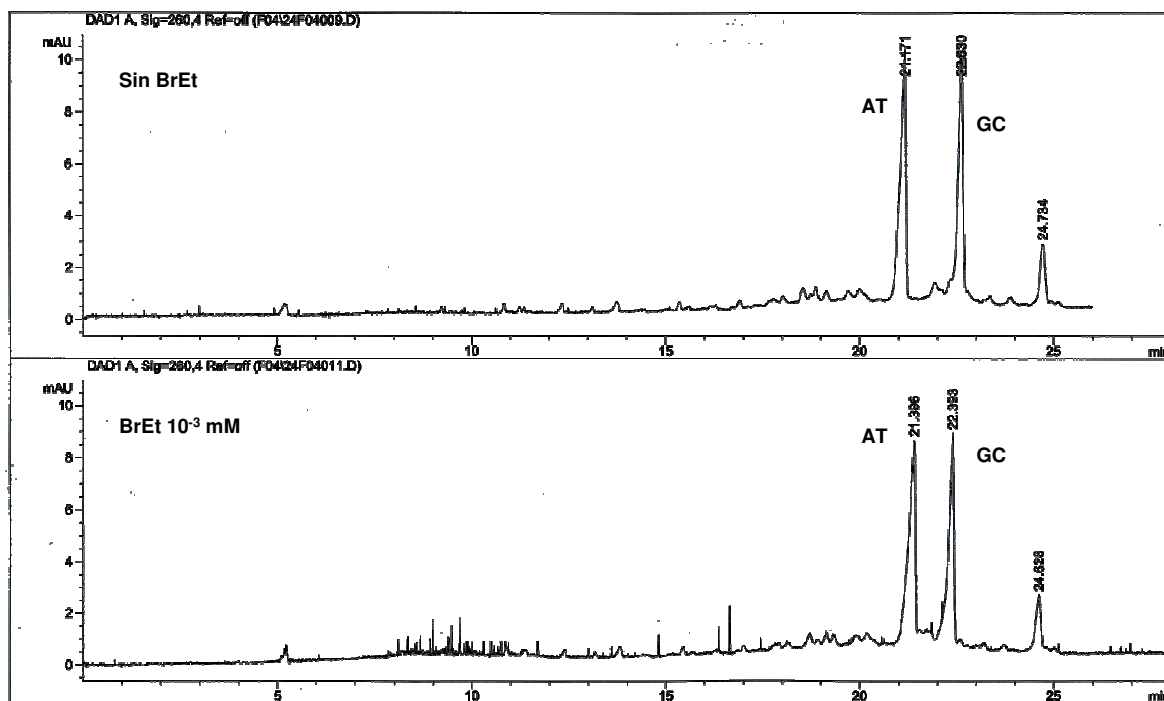
Figura 23. Espectros de emisión: de los oligonucleótidos AT y GC (izquierda) y bromuro de etidio (derecha).



Electroferograma 1



Electroferograma 2



Electroferograma 3

2. MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE PREFERENCIA DE SECUENCIA Y AFINIDAD EN LA UNIÓN DE LIGANDOS AL ADN BASADO EN CURVAS DE DISOCIACIÓN TÉRMICA DE ADN

En este trabajo se presenta el desarrollo de un ensayo basado en el análisis de curvas de disociación-asociación térmica de ADN en presencia de distintas concentraciones del ligando en estudio. Los principios fisicoquímicos subyacentes son conocidos y este tipo de análisis se utiliza desde hace décadas [218, 220, 223-225].

En la gran mayoría de los casos descritos el estado de asociación-disociación (en definitiva el porcentaje de cadena sencilla) se determina mediante espectrofotometría de absorción, aprovechando la diferencia de coeficiente de extinción entre los estados de doble cadena y cadena sencilla.

Las limitaciones tecnológicas, físicas y de sensibilidad de este tipo de técnicas hacen que el volumen mínimo de ensayo se sitúe alrededor de un mililitro y el número de muestras analizable de forma simultánea generalmente sea inferior a diez [226].

En el presente trabajo se ha explorado la posibilidad de desarrollar un ensayo, basado en análisis de curvas de asociación-disociación, que pueda aplicarse a un número elevado de muestras y con volúmenes de reacción muy reducidos.

En el apartado “Material y Métodos” de esta tesis se explican en profundidad los aspectos metodológicos desarrollados y que en realidad son un resultado en sí mismo.

2.1. Diseño experimental

El fundamento del ensayo que se ha desarrollado se basa en la utilización de un doble marcaje. En la estructura del ADN de cadena doble el fluoróforo de una de las cadenas, unido a la desoxirribosa de la posición 5' y el amortiguador de fluorescencia o *quencher* de la complementaria, en la posición 3', están muy próximos y con ello, la fluorescencia está extinguida. Cuando la doble hélice se desnaturaliza por calor, el fluoróforo y el *quencher* se separan y se produce un gran aumento en la fluorescencia.

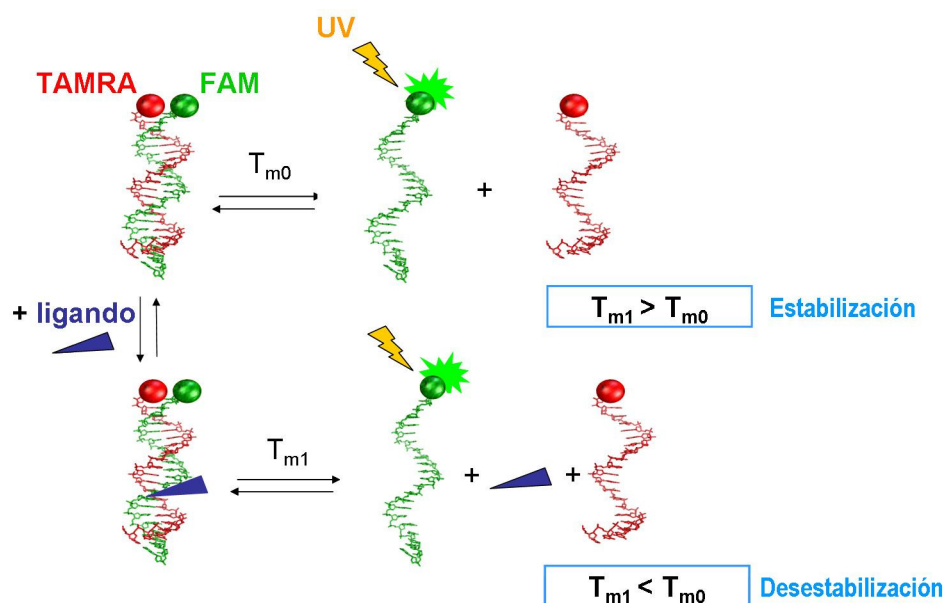


Figura 24. Representación esquemática del ensayo basado en el análisis de curvas de fusión para el estudio de la preferencia de unión de ligandos al ADN.

Existen diversas combinaciones posibles de fluoróforo y *quencher* que pueden dar el resultado deseado y que pueden ser incorporados de forma comercial en oligonucleótidos sintéticos. Se decidió utilizar la combinación FAM-TAMRA debido al elevado rendimiento cuántico de FAM como fluoróforo, que permite mayor sensibilidad en la detección y por otra parte, al eficiente efecto de *quenching* de TAMRA, cuyo espectro de excitación solapa casi totalmente con el de emisión de FAM [219].

Se emplea un termociclador para llevar a cabo simultáneamente los protocolos de disociación o asociación y la lectura de la emisión de fluorescencia a cada grado de temperatura ya que este aparato cumple la función de un espectrofluorímetro en el que se puede fijar una variación constante de la temperatura y que permite el estudio de 96 muestras en paralelo.

Por cada variación de un grado de temperatura, el sistema óptico interno del aparato va a registrar la fluorescencia de cada uno de los 96 pocillos. Esto genera un enorme número de datos. Llevando los datos a Excel, se obtiene una matriz de 96x3x75, ya que son 96 pocillos, 3 canales de lectura para cada uno (FAM y 2 controles internos) por los 75 °C que puede comprender un protocolo estándar de asociación o disociación. En total, son 21600 datos analíticos. Este elevado número de datos es prácticamente imposible de analizar manualmente. Por eso se ha llevado a cabo el desarrollo de herramientas de software.

2.2. Aplicación y validación del método con compuestos de diferente naturaleza y modo de unión

Para los primeros experimentos se diseñaron y sintetizaron dos oligonucleótidos de cadena doble, denominados AT y GC (con todas las posibles subsecuencias de cuatro bases formadas por los pares A y T o G y C, respectivamente; ver tabla 6) marcados con FAM y TAMRA según el esquema antes descrito (figuras 22 y 24). La secuencia de estos oligonucleótidos se diseñó con el fin de poder estudiar la preferencia de un número elevado de compuestos por sitios AT o GC. En la figura 25 se muestran los datos de un experimento de disociación con estos dos oligonucleótidos.

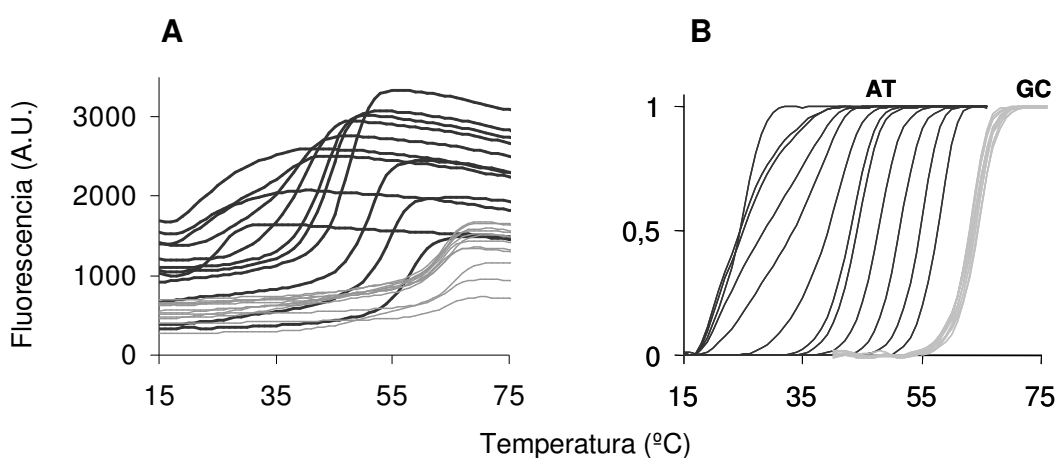


Figura 25. Representación de la fluorescencia de FAM de un experimento de disociación de oligonucleótidos sólo con ATs y otro sólo con GCs en presencia de concentraciones crecientes de Hoechst 33258 (de izquierda a derecha: 0, $1.95 \cdot 10^{-5}$, $3.91 \cdot 10^{-5}$, $7.81 \cdot 10^{-5}$, $1.56 \cdot 10^{-4}$, $3.13 \cdot 10^{-4}$, $6.25 \cdot 10^{-4}$, $1.25 \cdot 10^{-3}$, $2.5 \cdot 10^{-3}$, $5 \cdot 10^{-3}$, 10^{-2} y $2 \cdot 10^{-2}$ mM) frente a la temperatura. **A:** datos sin tratar. **B:** datos tratados.

En estas representaciones de los datos numéricos generados por el termociclador se puede apreciar un ruido inherente al propio equipo (figura 25.A) que es eliminado (figura 25.B) mediante tratamiento matemático. Una vez suavizado este ruido aún existen problemas debidos a las limitaciones del aparato, que no está diseñado para este uso. Así, las curvas no están normalizadas, o lo que es lo mismo, cada pocillo parte de una fluorescencia inicial. Además, se debe eliminar el fondo generado por la disminución de la fluorescencia con el cambio de pH generado por la elevada temperatura (figura 26). Esto determina la elección del tampón ya que su pK_a debe estar próximo al pH óptimo de trabajo, que es 7,5. El pH disminuye al aumentar la temperatura y con ello el fluoróforo se ioniza y disminuye su rendimiento cuántico [227]. Finalmente, representando el aumento de temperatura de fusión con la

concentración podemos ver la afinidad que presenta el compuesto por el oligonucleótido de esa secuencia, la estabilidad del complejo ADN-ligando y comparando distintas secuencias, se pueden obtener datos de preferencia de secuencia de unión.

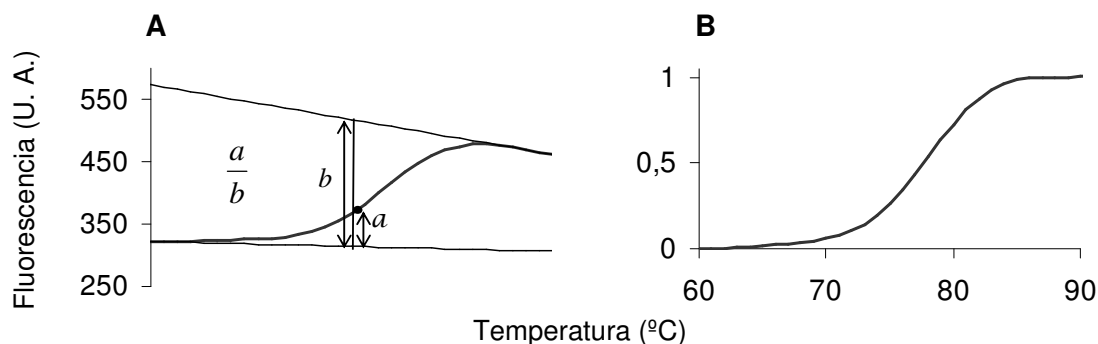


Figura 26. Normalización de las curvas de fusión.

Aunque en la figura anterior (fig. 26) se muestran curvas monofásicas, con algunos compuestos se han obtenido curvas multifásicas que reflejan la lenta cinética del proceso de unión de estos ligandos concretos al ADN. De este modo, en el ejemplo de la figura 27 se puede observar una primera curva de disociación, correspondiente al ADN libre y una segunda curva (o fase), que corresponde al aducto o complejo formado por el ADN con el compuesto unido covalentemente. Como se muestra en la figura 27, mientras la proporción de la primera fase disminuye, esta segunda fase aumenta con la concentración de ligando.

Las curvas multifásicas no sólo son propias de uniones al ADN de tipo covalente. Por ejemplo, este tipo de curvas están siempre presentes en caso de la fusión de ADN de tres cadenas (tríplex), donde una fase representa la disociación de una de las hebras de las otras dos y la segunda fase, a la de esas dos. Lo mismo ocurre con cuádruplex. Otro ejemplo de curvas bifásicas se ha obtenido con la unión del bromuro de etidio al oligonucleótido GC (figura 32).

Con respecto a las curvas bifásicas causadas por la unión de un ligando al ADN, existen diversas explicaciones e implicaciones [228]. Según McGhee [229], los mecanismos posibles se basan en que se trate de ligandos con uniones fuertes, ya sean reversibles o irreversibles, o bien en interacción cooperativa entre ligandos.

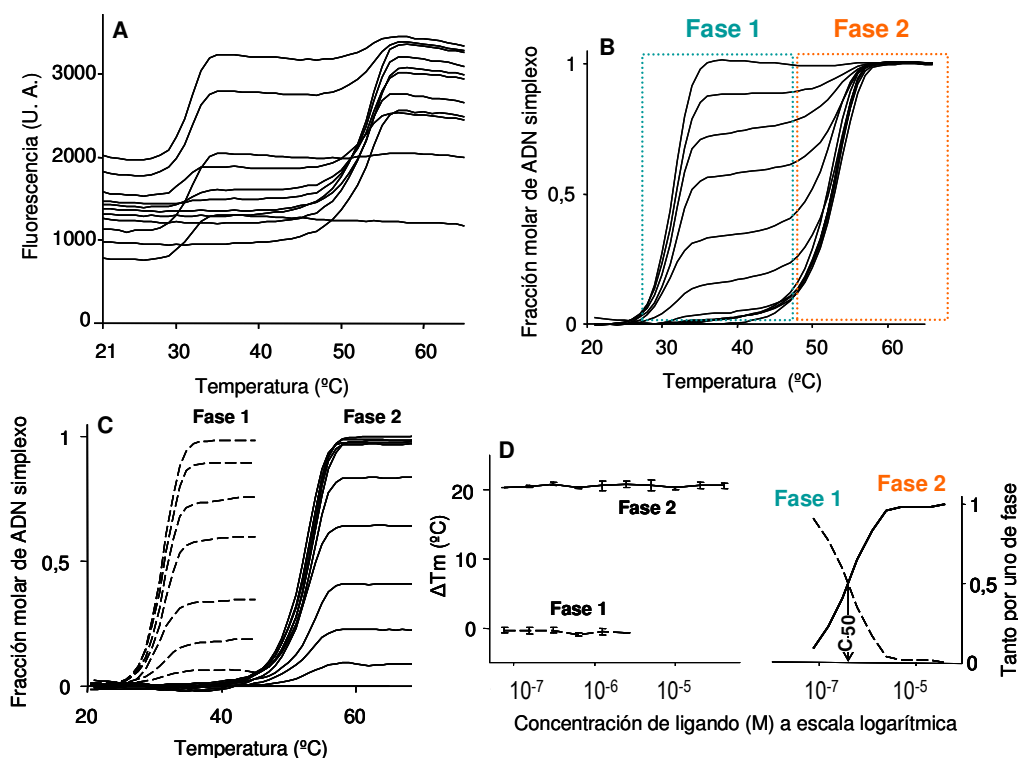


Figura 27. Curvas bifásicas obtenidas con uno de los compuestos estudiados. **A:** Curvas sin tratar. **B:** Curvas tratadas (normalizadas y con fondos eliminados). Las concentraciones de ligando son crecientes de izquierda a derecha. **C:** Separación de cada una de las fases mediante tratamiento matemático. **D:** Dos representaciones de la proporción de cada fase en función de la concentración de ligando.

De cara a validar este ensayo, se analizó la unión de una serie de ligandos ampliamente caracterizados mediante otros métodos. Se diseñaron nuevos oligonucleótidos conteniendo los sitios de unión de los compuestos correspondientes, así como otros similares, para poder verificar que se puede, a través de este método, establecer la preferencia de unión. Se emplearon ligandos que se unen al ADN por mecanismos diferentes, con el fin de determinar su aplicabilidad como método general.

A continuación se muestran los resultados obtenidos con ligandos con unión a los surcos (DAPI y Hoechst-33258), agentes intercalantes (bromuro de etidio, ditercalinio, doxorubicina, TOTO-I, tiocoralina-A y equinomicina) y compuestos con unión covalente al ADN (ecteinasquinas, pftalascquinas y derivados de ambas familias).

2.2.1. Aplicación a compuestos con unión a los surcos

DAPI

El DAPI (4',6-diamidino 2-fenilindol, ver figura 28), sintetizado por primera vez como análogo del berenil [230], se emplea como marcador fluorescente de ADN tanto libre como cromosómico [231]. Se une de forma no covalente al surco menor del ADN, aumentando entonces notablemente su emisión de fluorescencia [232-235], especialmente en regiones ricas en AT (AU, IC), con una alta constante de afinidad. También se ha visto una interacción de apilamiento π,π con pares de bases GC [236], aunque con menor afinidad, una constante de unión más baja y menor rendimiento de fluorescencia [237], llegándose incluso a hablar de *quenching* virtual con estas secuencias GC [234, 235, 238].

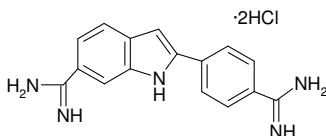


Figura 28. Estructura química del DAPI.

Como se muestra en la figura 29, hay una interacción débil de DAPI y el oligonucleótido GC ya que sólo se observa un aumento de temperatura de fusión (T_m) a concentraciones de DAPI elevadas, con lo que se demuestra que hay baja afinidad por secuencias ricas en GCs. Por el contrario, se observa una clara preferencia por AT, lo que concuerda con lo esperado.

A continuación, se hizo un estudio más detallado del sitio preferente de unión de este ligando. Para ello, se empleó una serie de oligonucleótidos con un sitio central formado por una o dos bases A y una o dos T, flanqueado por Gs y Cs.

Como se muestra en la gráfica, con los oligonucleótidos gATC y gTAC puede establecerse una ligera preferencia por el sitio AT frente a TA, ya que a iguales concentraciones del ligando, se observa mayor aumento en la T_m con la secuencia gATC. En cualquier caso la unión del DAPI a estas secuencias pobres en ATs es débil. La unión al oligonucleótido TATA es notablemente similar a la de gATC.

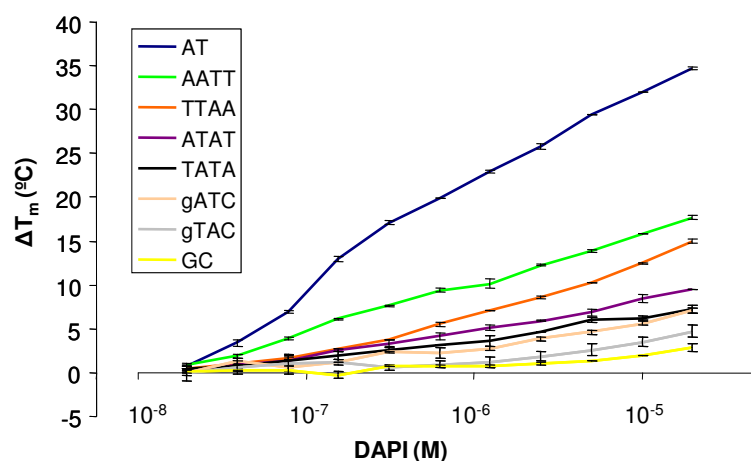


Figura 29. Incremento de la temperatura de fusión de los oligonucleótidos indicados en la leyenda, en función de la concentración de DAPI (en escala logarítmica).

La mayor preferencia tiene lugar hacia el sitio AATT, lo cual coincide plenamente con lo obtenido por otras metodologías (aumento de la fluorescencia con la unión [239], modelado molecular [240] y electroforesis [241]).

En conclusión, a la vista de la distinta variación de la temperatura de fusión causada por la unión de DAPI a los diferentes sitios formados por As y Ts, se ha podido establecer que el orden general de preferencia de unión de este ligando es AATT >> TTAA > ATAT > TATA.

Hoechst 33258

El sensible marcador fluorescente Hoechst 33258 también llamado bisbencimida o pibencimol, se emplea para teñir ADN incluso cromosómico [242, 243]. Se une al surco menor del ADN, preferentemente a secuencias ricas en ATs [244, 245] y necesitando al menos cuatro bases A/T seguidas [246, 247]. Se ha visto que puede interaccionar con ADN de forma electrostática, siendo esta unión inespecífica [248, 249].

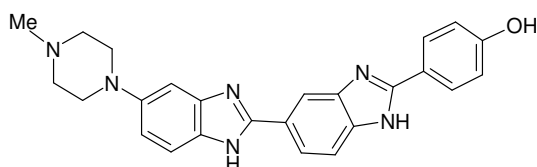


Figura 30. Estructura química del Hoechst 33258.

Como se muestra en la gráfica de la figura 31, el casi imperceptible incremento en la temperatura de fusión con el oligonucleótido GC indica que no hay interacción aparente con esta secuencia. Por el contrario, con la secuencia rica en ATs hay un destacable

aumento de T_m , que se corresponde con la alta afinidad de este compuesto por este tipo de bases.

Un estudio más profundo de secuencias pone de manifiesto que la presencia de tan solo dos bases A/T no es suficiente para que se produzca una interacción destacable. Además, se comprueba que Hoechst 33258 tiene una notable mayor preferencia por el sitio AATT, como se ha demostrado con otros ensayos como espectrometría de masas [177]. Mediante *footprinting* [246, 250] se ha observado, además, que hay una menor afinidad en la unión a sitios TpA, lo que concuerda con que los peores sitios de unión sean TATA y ATAT, como se muestra en la gráfica por el escaso ΔT_m independientemente de la concentración de ligando.

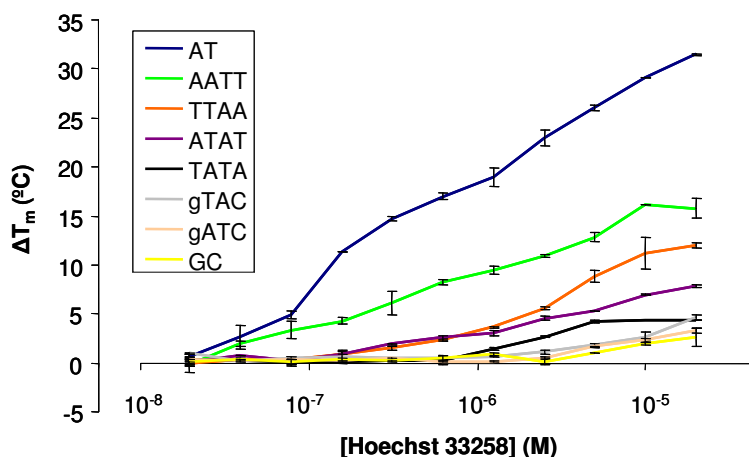


Figura 31. Incremento de la temperatura de fusión de los oligonucleótidos indicados en la leyenda, en función de la concentración de Hoechst 33258 (en escala logarítmica).

Las diferencias entre la unión a determinadas secuencias son mayores con este ligando que las observadas con DAPI, tal y como ya se ha descrito mediante otras técnicas [239].

2.2.2. Aplicación a agentes intercalantes

Bromuro de etidio

El bromuro de etidio (BrEt) es un monointercalante y el compuesto más comúnmente empleado para teñir y localizar ADN [67, 70, 217, 251, 252]. Está descrito que se une al ADN sin ninguna preferencia de secuencia. Sin embargo, a la vista de las curvas de

fusión realizadas con AT y GC en presencia de concentraciones crecientes de este ligando, se observa una unión claramente preferente por GC.

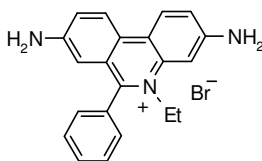


Figura 32. Estructura química del bromuro de etidio.

Las curvas del oligonucleótido rico en ATs son monofásicas, mientras que las de la secuencia rica en GCs son bifásicas incluso a las concentraciones más bajas (cercasas a 10^{-8} M). Este resultado indica que incluso a esas concentraciones se está formando el complejo etidio-GC y que éste tiene una razonable estabilidad (ΔT_m media de aproximadamente 15 °C, ver gráfica en la figura 33). No obstante, a concentraciones elevadas, los complejos formados con este agente y los sitios A/T presentan estabilidades similares, lo que explica su capacidad para teñir ADN de cualquier secuencia, ya que para ello se emplea a concentraciones altamente saturantes.

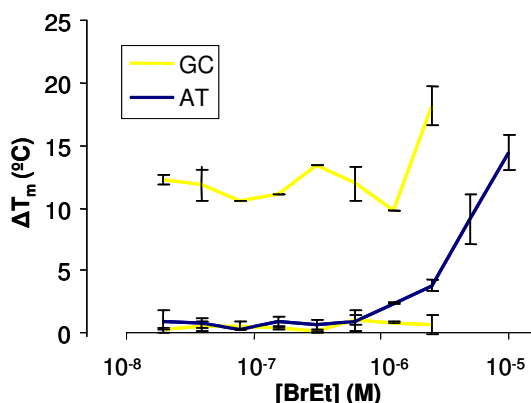


Figura 33. Incremento de la temperatura de fusión en el caso de los oligonucleótidos AT y GC en función de la concentración de bromuro de etidio (BrEt, en escala logarítmica).

Doxorrubicina

La doxorrubicina, comercialmente denominada Adriamicina, es un intercalante perteneciente a la familia de los antibióticos antraciclinas. Es un fármaco antitumoral que inhibe a la topoisomerasa II. Se trata de uno de los compuestos más usados en quimioterapia, empleado frente a una gran variedad de tumores sólidos y leucemias [253]. Se ha comprobado que es un intercalante y que además interacciona de forma no intercalante con As y Ts a través de su aminoazúcar (el N3' del amonio de esta daunosamina puede formar enlaces de hidrógeno) [254].

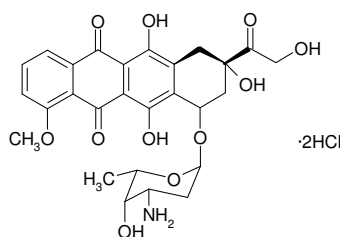


Figura 34. Estructura química de la doxorrubicina.

En base a las secuencias descritas en la bibliografía [255-257], se ha estudiado su unión a una serie de oligonucleótidos con sitios GpC y CpG, flanqueados por As y Ts. Sin embargo, como se muestra en la gráfica (figura 35), no se observan diferencias notables entre unas secuencias y otras, incluyendo al oligonucleótido AT, salvo en el caso del oligonucleótido GC, que es al que menos se une. Cabe destacar el hecho de que la unión al oligonucleótido AT sea prácticamente idéntica al resto de los oligonucleótidos empleados. Todo ello es indicativo de ausencia de preferencia por G/C, como ya se ha comprobado por otros métodos [258] [259]. Existen referencias que indican que este ligando es un intercalante no selectivo y que es posible que los datos que avalan su selectividad, obtenidos, por ejemplo, mediante cristalografía, fueran resultado de la unión forzada de la doxorrubicina a los extremos de las secuencias demasiado cortas requeridas para este tipo de ensayos [259, 260].

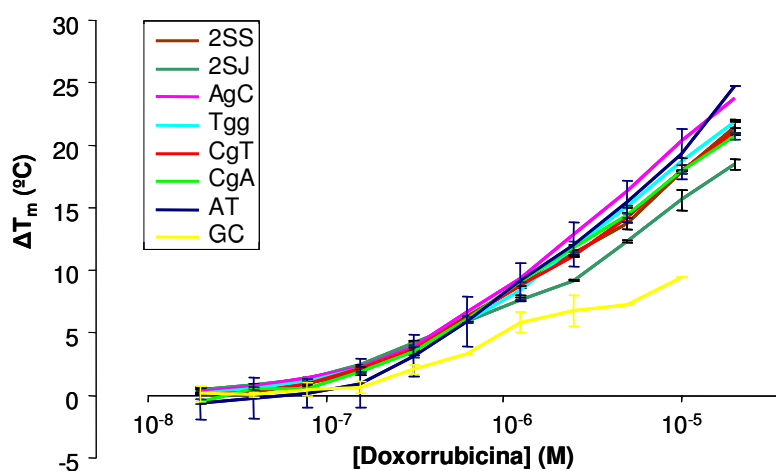


Figura 35. Incremento de la temperatura de fusión de los oligonucleótidos indicados en la leyenda en función de la concentración de doxorrubicina (en escala logarítmica).

TOTO-I

El homodímero de naranja de tiazol TOTO-I (de *Thiazole Orange homodimer*, figura 36) se caracteriza por el elevado aumento de su fluorescencia al unirse a ADN, por lo

que se le emplea como marcador para tinción en geles de agarosa para visualizar separaciones y distinguir tamaños o como tinción de ADN en células con numerosas aplicaciones [73-78].

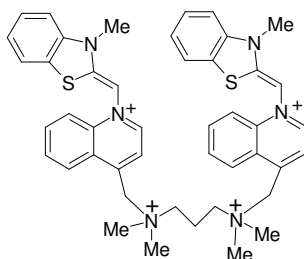


Figura 36. Estructura del TOTO-I.

Se ha profundizado en el estudio de la unión de este compuesto al ADN, empleando para ello un juego de oligonucleótidos formados por Gs y Cs, a las que el TOTO-I se une débilmente y un sitio central de dos o cuatro As y Ts en distinto orden.

De cara a facilitar el análisis comparativo de unión a las distintas secuencias estudiadas, se ha utilizado el parámetro C_{50} , que corresponde a la concentración de ligando a la que se obtiene la mitad del efecto máximo, es decir, el mayor incremento de temperatura, que es el que se obtiene a la concentración máxima de compuesto empleada para todas las secuencias estudiadas. Se ha utilizado este parámetro en particular con este compuesto debido a la variabilidad de los resultados obtenidos con los oligonucleótidos estudiados y puesto que las curvas de incremento de T_m frente a la concentración tienen un comportamiento sigmoideo, lo cual facilita la determinación de la T_m máxima.

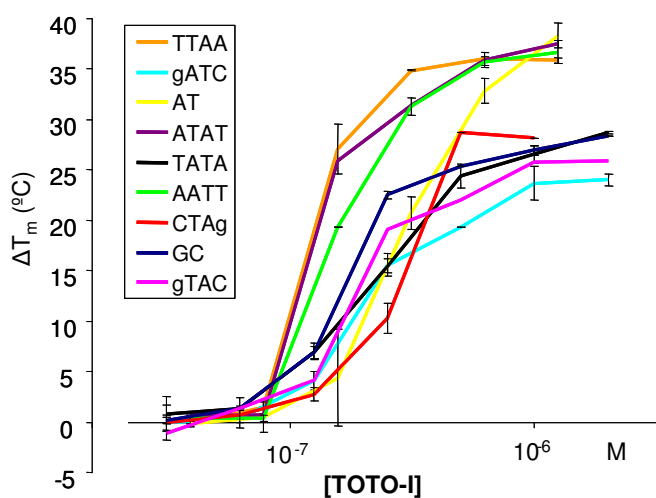


Figura 37. Incremento de temperatura frente a concentraciones crecientes de TOTO-I con las secuencias que se muestran en la leyenda.

Tabla 7. Incremento máximo de temperatura (1 μM TOTO-I) y valores de C_{50} para cada oligonucleótido.

Oligo	$\Delta T_m \text{ máx (}^\circ\text{C)}$	$C_{50} (\times 10^{-1} \mu\text{M})$
TTAA	35,91	1,34
ATAT	36,88	1,35
AATT	36,3	1,53
GC	26,93	1,84
gATC	23,64	1,91
gTAC	25,83	1,94
TATA	26,54	2,43
AT	36,13	2,96
CTAg	28,11	3,05

Con los oligonucleótidos ATAT, TTAA y AATT se obtiene la menor C_{50} , lo que indica que el TOTO-I tiene una mayor afinidad por ellos. Según Wemmer [261], se formarían varios complejos con los oligonucleótidos ATAT y TTAA y también podría ocurrir con el oligonucleótido AT. Según nuestros resultados, parece que ocurre igual con AATT, pero no con TATA.

De la misma manera, se podrían estar uniendo varias moléculas de TOTO-I al GC, aunque con menor estabilidad o afinidad que por las secuencias A-T.

Además, de nuevo de acuerdo con los resultados obtenidos por Wemmer, sólo hay un sitio de unión del TOTO-I en el oligonucleótido CTAg. Mediante RMN se ha visto que el TOTO-I se une selectivamente a este sitio CTAG por intercalación. Los benzotiazoles se introducen entre las pirimidinas y los quinolinios entre las purinas. El *N*-metilo del benzotiazol se aloja en el surco mayor y la cadena de unión de los monómeros o *linker* (poli-propilenamino) se sitúa en el menor [262].

La unión del TOTO-I a este oligonucleótido causa un ΔT_m mayor (complejo más estable) que la unión a los sitios gTAC y gATC, lo cual concuerda con que CTAg sea el sitio descrito como preferente. Sin embargo, la C_{50} para CTAg es la mayor, lo cual se relaciona con una unión menos afín, aunque una vez formado el complejo, su alta estabilidad haga que se disocie con menor facilidad.

Por todo ello, podemos concluir que es necesario tener en cuenta el número de sitios posibles de unión de un oligonucleótido para poder extraer conclusiones de cara a la preferencia en la unión de cualquier ligando.

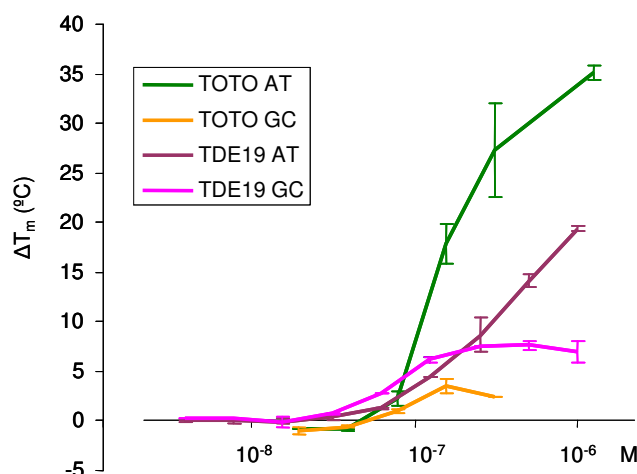


Figura 39. Incremento de temperatura de fusión de los oligonucleótidos AT y GC frente a la concentración de los compuestos TOTO-I y TDE-19.

A la vista de los resultados obtenidos con el ligando TDE-20 (figura 40) parece que presenta mayor afinidad por el oligonucleótido AT, ya que se produce mayor aumento en la temperatura de fusión a menores concentraciones de TDE-20 con el oligonucleótido AT que con el GC.

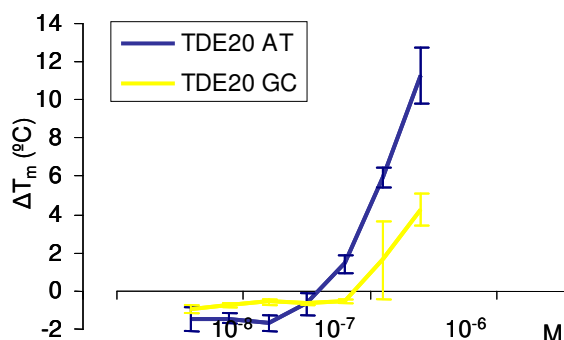


Figura 40. Incremento de temperatura de fusión frente a la concentración de TDE-20, estudiado con los oligonucleótidos AT y GC.

Si se comparan los datos experimentales obtenidos con los tres compuestos (TOTO-I, TDE-19 y TDE-20; figura 41) se puede observar que el efecto de la unión de TOTO-I al oligonucleótido AT es mucho más pronunciado que el causado en la misma secuencia por sus dos análogos. Sin embargo, en lo que respecta al oligonucleótido GC, se produce mayor interacción con TDE-19, siendo el comportamiento del compuesto TDE-20 y el TOTO-I muy similares entre sí.

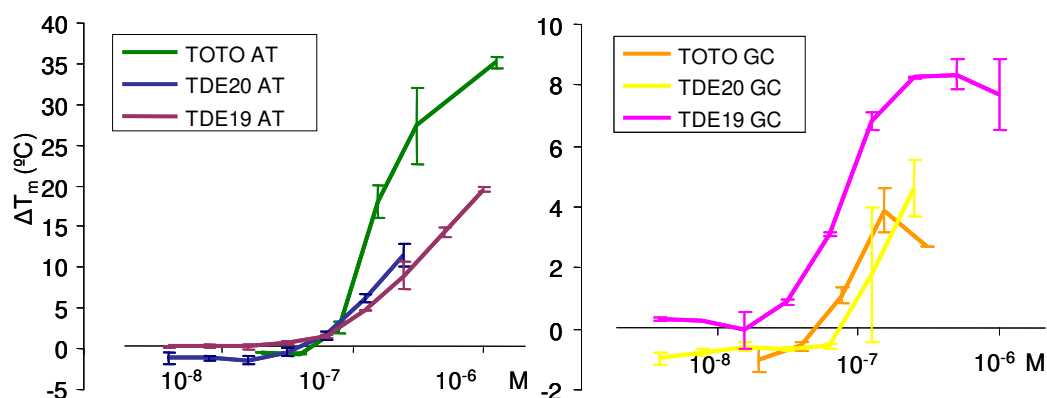


Figura 41. Incremento de temperatura de fusión de los oligonucleótidos AT (izquierda) y GC (derecha) frente a la concentración de los compuestos TOTO-I, TDE-20 y TDE-19.

Tiocoralina-A y equinomicina [263]

La tiocoralina-A es un compuesto antitumoral aislado del micelio del actinomiceto marino *Micromonospora* sp. L-13-ACM2-092, [264-266] que presenta una potente actividad antineoplásica frente a distintas líneas tumorales. Su unión al ADN no había sido estudiada en profundidad, aunque existen datos previos de *footprinting* que han sido confirmados y ampliados mediante nuestra técnica. Se utilizó el antibiótico quinoxalínico equinomicina con el fin de comparar los resultados obtenidos con tiocoralina con los de este compuesto ampliamente estudiado y de este modo, contribuir también a la validación del método.

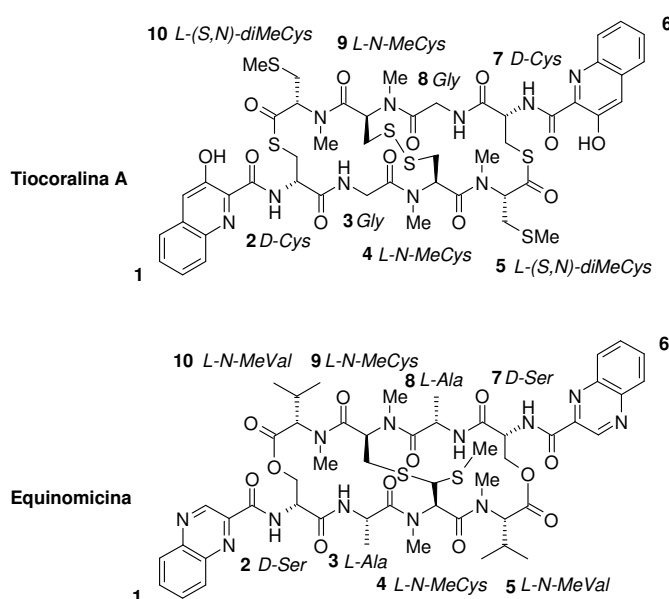


Figura 42. Estructura de la tiocoralina A y la equinomicina. Los aminoácidos están en cursiva y los residuos numerados en negrita. Cabe resaltar la presencia de un enlace central tioacetal en la equinomicina, reemplazado por un puente disulfuro en la tiocoralina A (y triostina A).

La bibliografía recoge que tanto la equinomicina como la tiocoralina-A (octadepsipéptidos cíclicos) se unen al ADN por bis-intercalación [267-269] entre pares CpG [267].

Se ha confirmado la unión preferente de ambos ligandos a secuencias ricas en GC frente a AT y en concreto al par CpG. Además, se ha estudiado el efecto de las bases flanqueantes del par CpG, diseñando para ello los oligonucleótidos necesarios.

El aumento máximo en la temperatura de fusión (ΔT_m) del oligonucleótido AT (en presencia de una concentración 20 μM de tiocoralina) es tan sólo de 6 $^{\circ}\text{C}$. Sin embargo, en el caso del oligonucleótido GC, el aumento de T_m con la misma concentración es de casi 18 $^{\circ}\text{C}$, pudiéndose observar efectos en la T_m incluso a concentraciones bajas (figura 43.A). Comparando con los resultados para la equinomicina, cabe destacar que un mismo valor de ΔT_m se obtiene a concentraciones de tiocoralina unas diez veces menores que para la equinomicina, lo que sugiere una asociación más fuerte al ADN.

Como se muestra en la figura 43.B, el oligonucleótido ACGA (también llamado CgA, con el paso CpG) presenta una mayor estabilización en presencia de ambos ligandos, frente a los oligonucleótidos con los pasos GpG/CpC o GpC (dúplex TGGT y AGCA, respectivamente). Esto indica una mayor preferencia por el sitio CpG.

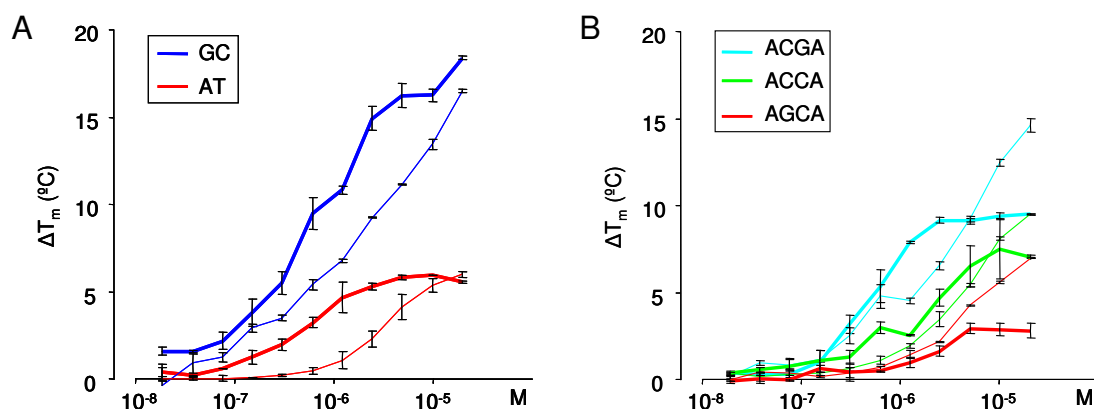


Figura 43. A: Efecto en la temperatura de fusión de los dúplex AT y GC con la adición de concentraciones crecientes (escala logarítmica) tanto de tiocoralina (líneas gruesas) como de equinomicina (líneas finas). Las barras de error corresponden al valor medio de tres medidas independientes. **B:** Incrementos de temperatura de fusión causados por la unión de tiocoralina (líneas gruesas) y equinomicina (líneas finas) a los oligonucleótidos TGGT/ACCA, AGCA/TGCT y ACGA/TCGT.

Por otra parte, se observan diferencias significativas en la unión de tiocoralina y equinomicina a los oligonucleótidos ACGT, TCGA, GCGC, CCGG, GCGG y GCGT,

con lo que se puede afirmar que las bases flanqueantes al sitio de bis-intercalación CpG (tabla 8 y figura 44) influyen en la selectividad de secuencia. Para la tiocoralina, el mayor incremento de T_m se produce con la secuencia ACGG (10.6 °C) y el menor, con GCGC (6.1 °C). Con equinomicina la mayor estabilización del dúplex se da con ACGT, lo cual está de acuerdo con resultados recientemente publicados, que muestran una cinética de disociación más rápida de TCGA frente a ACGT, mientras que el efecto en ACGA es más dependiente de la concentración.

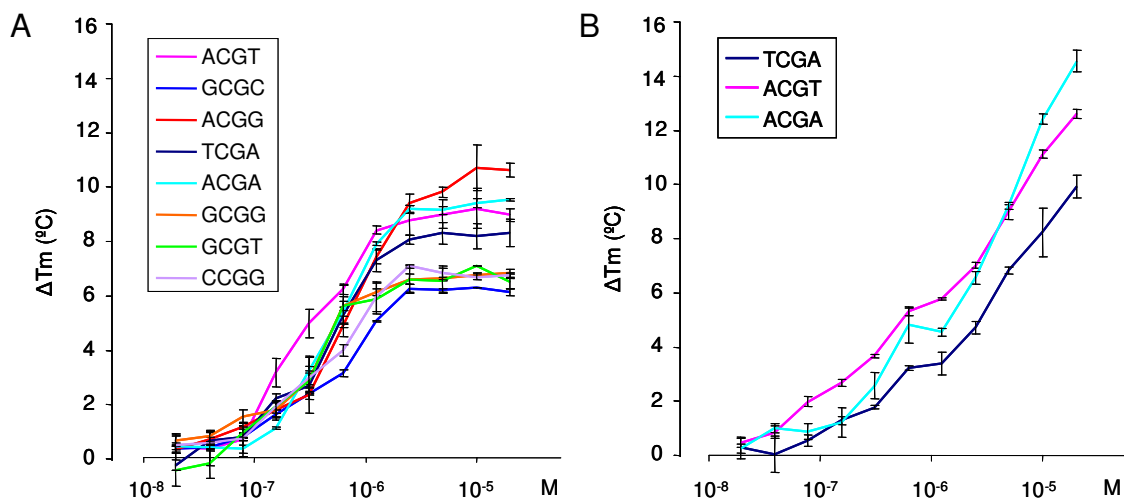


Figura 44. Incrementos de temperatura de fusión producidos por la unión de (A) tiocoralina y (B) equinomicina a los oligonucleótidos indicados en la leyenda, que contienen un paso CpG con distintas bases flanqueantes.

A pesar de que el mayor efecto en la fusión del ADN se produce con el oligonucleótido GC, conviene considerar que en su secuencia hay al menos tres posibles sitios de unión para estos bis-intercalantes. Con el fin de confirmar el aumento de estabilización por la unión a dos sitios independientes de forma más precisa, se han analizado dos oligonucleótidos que contienen un par de pasos CpG: 2SS (“2 Sitios Separados”), que contiene un sitio ACGT y otro TCGA separados por la secuencia AATA, y 2SJ (“2 Sitios Juntos”), con los mismos sitios que el anterior pero seguidos. Como se puede ver en la figura 45, la unión de dos moléculas de tiocoralina a dos sitios independientes y no solapantes da lugar a una mayor estabilización del ADN, que es aún más notable en el caso del oligonucleótido con los sitios de unión yuxtapuestos (tabla 8). Esto parece indicar que la unión es cooperativa. De hecho, está demostrado que existe cooperatividad en la unión de la equinomicina al ADN y estos resultados también lo avalan (figura 45).

Una diferencia notable en el perfil de todas las curvas de ΔT_m de estos dos compuestos reside en la presencia de un *plateau* (o meseta) que parece indicar saturación en la unión de la tiocoralina a altas concentraciones y que no se da en el caso de la equinomicina. Esto podría indicar una unión inespecífica de éste último ligando a altas concentraciones.

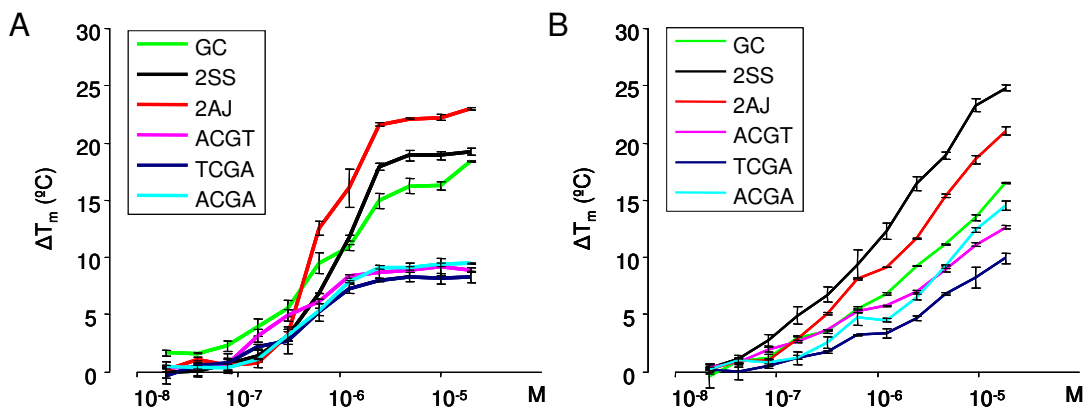


Figura 45. Incremento de T_m comparando la disociación de oligonucleótidos con un solo sitio de unión y dos sitios juntos o separados en presencia de concentraciones crecientes de tiocoralina (A) y equinomicina (B).

Los valores de C_{50} (concentración a la que se alcanza un aumento de temperatura de fusión que es la mitad del máximo) se pueden relacionar indirectamente con constantes de disociación, pudiéndose así comparar afinidades por una misma secuencia entre tiocoralina y equinomicina. Puesto que se necesitan concentraciones aproximadamente diez veces mayores de equinomicina para alcanzar un mismo ΔT_m , se puede concluir que la afinidad de la tiocoralina por el ADN es un orden de magnitud mayor.

Por otra parte, las diferencias en ΔT_m para los distintos oligonucleótidos en presencia de concentraciones iguales del mismo compuesto (por ejemplo, 20 μM para la ΔT_m máxima, ver tabla 8), reflejan el diferente grado de estabilización del dúplex causado por la unión del ligando.

Los resultados se corresponden con los datos existentes de *footprinting*, RMN y cristalografía de rayos X. Además, se apoyan en recientes estudios de modelado molecular [263].

Tabla 8. Parámetros que caracterizan la unión de la tiocoralina a los oligonucleótidos estudiados (tabulados en orden decreciente de estabilización del dúplex).

Oligo	ΔT_m máx (°C)	C_{50} ($\times 10^{-1} \mu M$)
2SJ	23,0	0,71
2SS	19,3	0,93
GC	17,3	0,78
ACGG	10,6	0,79
ACGA	9,4	0,55
ACGT	9,0	0,31
TCGA	8,2	0,46
ACCA	7,1	1,60
GCGC	6,7	0,39
CCGG	6,7	0,49
GCGT	6,7	0,31
GCGC	6,1	0,59
AT	5,7	0,57
AGCA	2,9	1,74

2.2.3. Aplicación a compuestos con unión covalente al ADN

Una destacable novedad de esta metodología es su aplicabilidad al estudio de la interacción con ADN de compuestos que se unen a esta biomolécula mediante enlaces covalentes, ya que la aplicación de este tipo de ensayos a compuestos con unión covalente al ADN no había sido descrita anteriormente.

En esta Tesis se ha llevado a cabo la caracterización de la unión a ADN de una serie de compuestos de la familia de las ecteinascidinas y pftalascidinas. En primer lugar y para continuar con la validación del ensayo, se han comprobado resultados obtenidos anteriormente mediante otras técnicas como modelos computacionales y *footprinting* [270, 271]. Seguidamente, se ha profundizado en la caracterización de la unión de estos compuestos a ADN.

Ecteinascidinas y derivados

Las ecteinascidinas son agentes antitumorales muy potentes y reciben ese nombre por haber sido aislados de ascidias marinas como *Ecteinascidia turbinata* [8]. Son alquilantes de guanina y se unen al ADN formando un enlace covalente con la guanina de una hebra y puentes de hidrógeno con la hebra complementaria [271].

De entre ellas destaca, en primer lugar, el medicamento ET743 (Yondelis® o trabectedina), que está actualmente en ensayos clínicos en fase II/III y ha sido recientemente aprobado por la Comisión Europea para el tratamiento del sarcoma de tejidos blandos [272]. Su unión al ADN produce roturas de la doble hélice (DSB, de *double-strand breaks*) y parece activar a la maquinaria de reparación por recombinación homóloga, de forma parecida al mecanismo de acción de la mitomicina-C, que es un agente alquilante que une covalentemente a las dos cadenas de una molécula de ADN (ICL, de *interstrand cross-linker*) [273, 274].

Esta familia está formada por multitud de compuestos que comparten gran similitud en su estructura química, formada por dos o tres anillos tetrahydro-isoquinolínicos y un grupo funcional reactivo que es una carbinolamina. Esta carbinolamina va a reaccionar con el N2 de la guanina del surco menor para formar el complejo covalente [8].

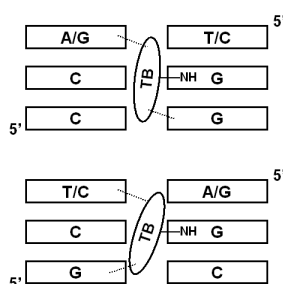


Figura 46. Representación esquemática de las uniones de la ecteinascidina trabectedina (TB) al ADN.

El grupo hidroxilo de la carbinolamina, presente en ET743, ET729 y Pt650 (una phtalascidina), ha sido sustituido por un grupo ciano en algunos compuestos de esta serie, como ET770. PM01183 es un análogo de ET743, con algunas modificaciones en la subunidad C. Zalypsis® (o PM00104 en adelante PM104) y PM113 están relacionados estructuralmente con los compuestos marinos naturales jorumicina y renieramicinas.

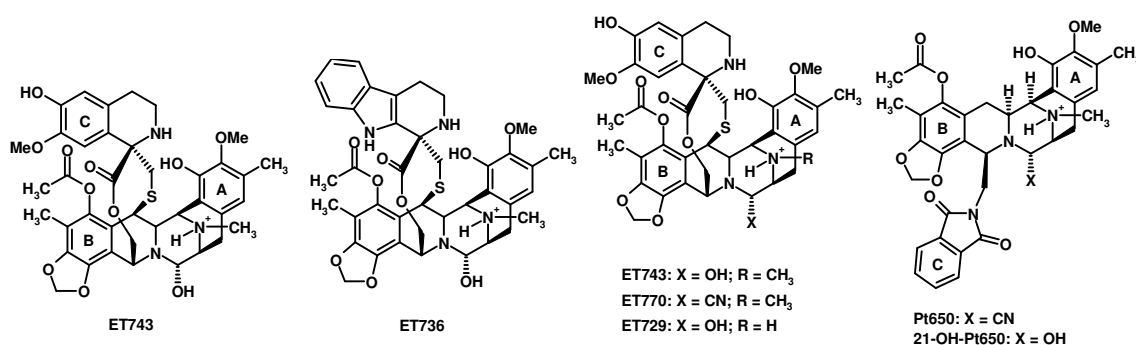


Figura 47. Estructura química de ecteinascidinas y phtalascidinas.

Con todos estos compuestos se han obtenido curvas multifásicas, lo que indica que el proceso de unión de estos ligandos al ADN tiene una cinética lenta. En el ejemplo de la figura 47 se puede observar una primera curva de disociación, correspondiente al ADN libre y una segunda curva (o fase), que corresponde al aducto o complejo formado por el ADN con el compuesto unido covalentemente. Como se muestra en la figura 48, mientras la proporción de la primera fase disminuye, esta segunda fase aumenta con la concentración de ligando.

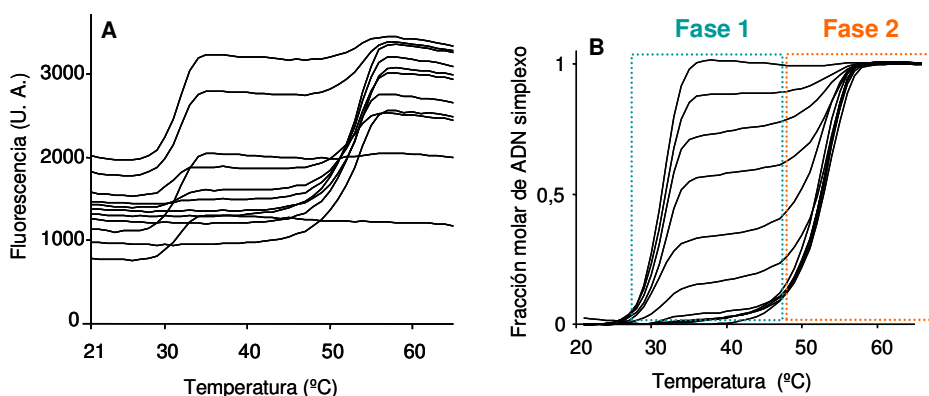
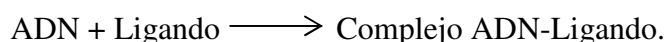


Figura 48. Curvas bifásicas obtenidas en la disociación del oligonucleótido Tgg en tampón fosfato en presencia de diferentes concentraciones de ET743 tras un día de incubación a 25 °C. **A:** Curvas sin tratar. **B:** Curvas tratadas (normalizadas y con fondos eliminados). A las seis concentraciones más bajas de ET743 se observa una primera curva de disociación (fase 1), correspondiente al ADN libre y una segunda curva (fase 2), que corresponde al aducto. Las concentraciones son crecientes de izquierda a derecha.

En el caso de uniones fuertes como ocurre con las ecteinascidinas, la aparición de curvas bifásicas se explica por una lenta cinética de unión entre el ligando y el ADN, lo que produce dos poblaciones o especies de ADN, la libre y la que forma parte del complejo, que se disocian de forma separada. Por lo tanto, se obtendrán curvas bifásicas a concentraciones no saturantes de ligando, mientras que al aumentar la concentración aumentará la segunda fase o población hasta alcanzar la saturación [201, 220, 275, 276].

En estas curvas bifásicas en presencia de ligando, el valor de la concentración de éste a la que la mitad de las moléculas de ADN forman parte del complejo (C_{50}) se emplea para el cálculo de la constante de unión (K) de la reacción:



En este caso, este parámetro C_{50} no es exactamente el mismo que el utilizado con compuestos que al unirse al ADN hacen que las curvas de fusión de éste sean monofásicas. En ambos casos corresponde a la concentración de ligando a la que se

obtiene la mitad del efecto máximo, pero en el caso de curvas monofásicas el efecto máximo es el mayor incremento de temperatura.

Por medio de la metodología descrita se ha estudiado, en primer lugar, la unión al oligonucleótido Tgg (con un sitio Tgg, descrito como uno de los mejores sitios de unión para ET743 [270, 271]), de los compuestos ET743, ET729, PM113 (también llamado Ptalascidina 650), PM01183 (o MeO-ET736, en adelante PM1183), ET770 (o PM1370), PM112. Así, se ha comprobado que las constantes de unión de todos los derivados que contienen el hidroxilo son mayores que los que presentan el grupo ciano, ya que este último es peor grupo saliente que el hidroxilo. Dentro de los derivados con hidroxilo, ET743 y ET729 son los que presentan mayor afinidad (es decir, menores K y C_{50}), quizás debido a que su anillo C presenta la posibilidad de formar puentes de hidrógeno con el esqueleto azúcar-fosfato del ADN. Una vez que se elimina el grupo ciano o hidroxilo en el proceso de formación del aducto con ADN, este complejo covalente es igual. Por ello, el incremento de temperatura de fusión es igual para ET743 que para ET770, ya que ambos ligandos sólo difieren en que aquel tiene un hidroxilo y éste un ciano. En el caso de PM104, cuyo grupo carbinolamina contiene hidroxilo, se observa una afinidad por el ADN similar a ET743; la menor temperatura de fusión indica una menor estabilización del aducto ADN-PM104, lo que parece estar correlacionado con las diferencias de su subunidad C con respecto a la de ET743.

Compuesto	TGG		
	C50	K	ΔT_m
ET743	2,70E-07	3,30E+03	22,2
ET729	5,30E-07	2,20E+03	21,8
PM104	2,10E-06	6,10E+02	14
ET770	2,10E-06	2,40E+02	22,4
Pt650	8,20E-07	8,40E+02	19,4

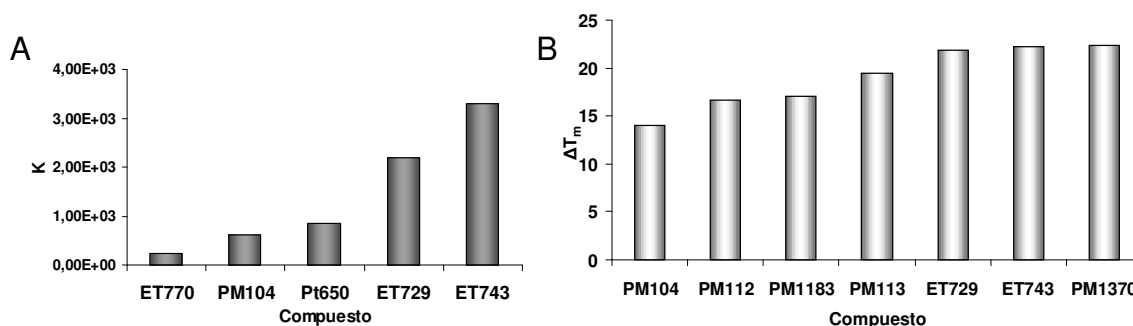


Figura 49. Resultados obtenidos en la disociación tras incubar un día a 25°C diferentes compuestos que se unen covalentemente al oligonucleótido Tgg en TAE 2X. **A:** Diferentes constantes de unión. **B:** Incrementos de temperatura de fusión con respecto al control. Los resultados de ET743 y ET729 están en

concordancia con lo descrito en la bibliografía [261, 269], mientras que el resto no habían sido estudiados previamente.

En segundo lugar, se ha estudiado la preferencia de unión de ET743 y ET729 entre los tripletes Tgg, AgC, ggC, Cgg y AgA, CgA, empleando As y Ts como bases flanqueantes ya que no se une a éstas. Los cuatro primeros tripletes (pirimidina-gg y purina-gC, ver figura 50) ya habían sido descritos como sitios favorables de unión de estos compuestos, mientras que AgA ha sido descrito posteriormente [277, 278]. El resultado más destacable entre ambos compuestos se obtiene con CgA, ya que ET743 apenas se une a este sitio (en cualquier caso, no se trata de unión covalente [277]), presentando curvas monofásicas con un aumento de temperatura de fusión muy bajo y sólo a concentraciones altas (ver figura 50).

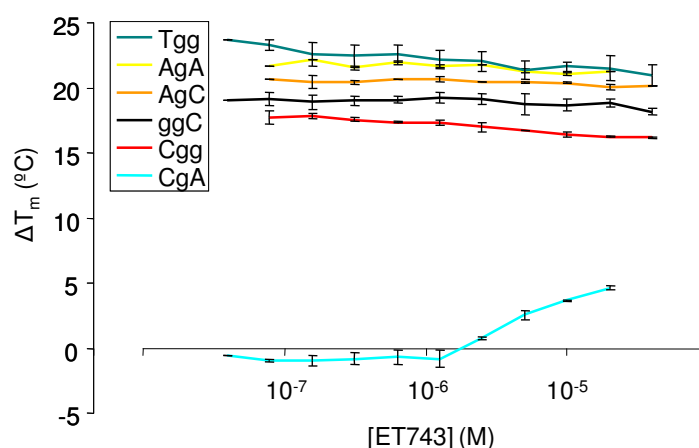


Figura 50. Incremento de la temperatura de fusión de los oligonucleótidos indicados en la leyenda en función de la concentración de ET743 (en escala logarítmica).

Para el resto de tripletes el perfil de las curvas de disociación es similar ya que siempre hay dos fases y la segunda, correspondiente al complejo, está caracterizada por una estabilización (ΔT_m) que ronda los 20 °C (ver figuras 51.A y C). Esta alta estabilización del dúplex se ha relacionado con el bloqueo de la transcripción y de las horquillas de replicación por su implicación en la inhibición del desenrollamiento y separación de las cadenas del ADN [274].

Cabe destacar que el complejo de menor estabilidad formado por ET743 ocurre con el sitio Cgg, mientras que con esta secuencia, el complejo con ET729 es el de mayor estabilidad junto con AgA y Tgg, que son también los sitios más estabilizados por ET743. Los tripletes purina-gC (ggC y AgC) son sitios de estabilización intermedia para ambos ligandos, lo cual podría estar relacionado con el hecho de que con este tipo de

sitios se formen los dos enlaces de hidrógeno con la hebra opuesta al enlace covalente (ver esquema en la figura 46), que parece ser reversible.

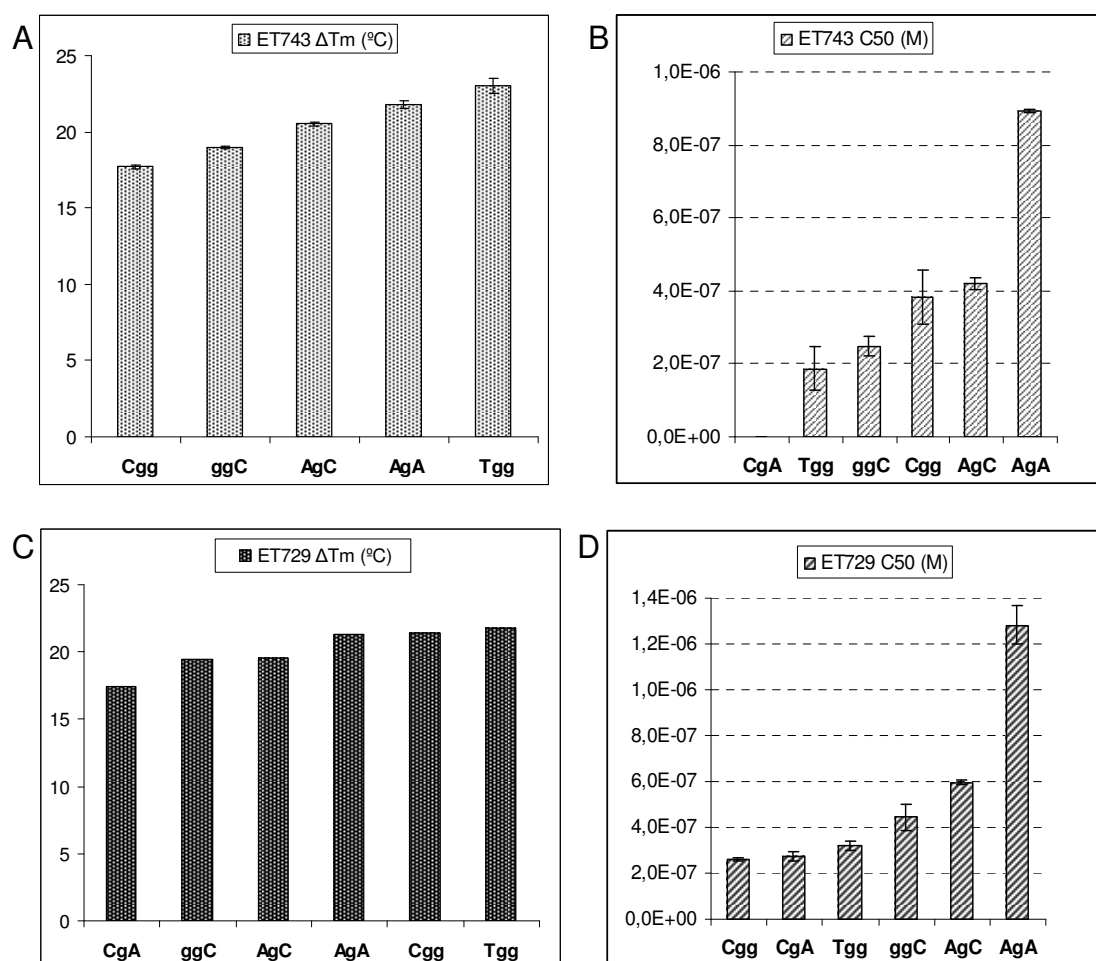


Figura 51. Resultados obtenidos tras incubar 24 horas a 25 °C. **A y C:** Aumento en la temperatura de fusión (ΔT_m) de los oligonucleótidos indicados con ET743 y ET729, respectivamente; concretamente es el ΔT_m del aducto (ΔT_m medio de la fase 2). **B y D:** C₅₀ de los experimentos anteriores.

En base a la C₅₀ requerida para cada sitio (ver figuras 51.B y D), el orden de afinidad de ET743 es Tgg > ggC > Cgg ≥ AgC >> AgA y el de ET729, Cgg ≥ CgA ≥ Tgg > ggC > AgC >> AgA. En ambos casos, Tgg y ggC son los mejores sitios, frente a AgC y sobre todo AgA, que son los peores. De nuevo, la mayor diferencia entre estos dos compuestos estriba en el sitio Cgg, necesitándose el doble de concentración de ET743 para alcanzar la misma cantidad de complejo. En términos generales, la afinidad de ET743 por el ADN es ligeramente mayor que la de ET729 (puesto que C_{50s} ET729 son mayores que C_{50s} ET743).

Todos estos experimentos de fusión se llevaron a cabo después de incubar las mezclas ADN-ligando durante 24 horas a 25 °C. Se estableció este periodo de incubación ya que

a tiempos más cortos había un bajo nivel de saturación. Por lo tanto, la reacción de unión de estos ligandos al ADN es muy lenta.

Por otra parte, se probó a cambiar la temperatura de incubación a 37 °C (temperatura fisiológica) para estudiar la unión de PM104, PM113, PM1183 y ET743 a distintos sitios GpC. A esta temperatura los experimentos no concuerdan con los obtenidos a 25 °C y además, se observa que es necesaria una mayor concentración de cualquiera de los cuatro ligandos para conseguir el mismo efecto que se conseguía o bien sin incubar o bien incubando 24 horas a 25 °C.

Por tanto, se sospecha que los ligandos son termolábiles y estén sufriendo degradación al incubar a 37 °C durante 24 horas. Con el fin de comprobar esta hipótesis, se llevaron a cabo tres series de diluciones de los cuatro compuestos que se incuban durante 24 horas. Dos de ellas se realizaron en TAE 2X, en las mismas condiciones en las que se llevó a cabo el experimento de fusión. De ellas, una se incubó a 25 °C y otra a 37 °C. Por otra parte, la tercera serie se diluyó empleando exclusivamente DMSO y se incubó a 37 °C. Tras las 24 horas de incubación en las diferentes condiciones, se realizó el experimento de fusión típico empleando el oligonucleótido AgC (con el sitio AgCA).

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 9, donde $\Delta T_{m \text{ máx}}$ es el incremento de temperatura de fusión del aducto (ΔT_m medio de la fase 2) y C_{50} es la concentración de ligando necesaria para que el 50% del ligando forme parte del complejo con ADN.

Tabla 9. C_{50} de los compuestos indicados en su unión al sitio AgCA tras incubar en las condiciones indicadas (en las dos últimas columnas se incubó antes de añadir el ADN).

Compuesto	C_{50} (μM)		
	t_0 (15 min)	24h·25°C pre-ADN	24h·37°C pre-ADN
ET743	1,56 \pm 0,01	0,54	1,82
PM1183*	4,70 \pm 0,13	0,84	3,00
PM113	0,66 \pm 0,12	1,08	2,27
PM104	0,79 \pm 0,12	1,11	2,89

*: Con PM1183 se utiliza la C_{20} , ya que no se alcanza C_{50} .

Se observa una considerable disminución de C_{50} al incubar un día a 25 °C, con respecto al mismo periodo a 37 °C, mientras que al tiempo inicial (t_0 , 15 minutos) C_{50} es similar o más baja, según el compuesto. Se ha visto que ocurre lo mismo con otras secuencias de unión de estos ligandos, como AgA o CgA, por ejemplo.

Mediante las tres distintas pre-incubaciones de compuesto solo se ha comprobado que hay un notable cambio en la concentración necesaria para alcanzar un mismo porcentaje de complejo dependiendo de cuales sean las condiciones empleadas. De este modo, el cambio de actividad tras 24 horas de incubación (ver figura 52) es indicativo de degradación.

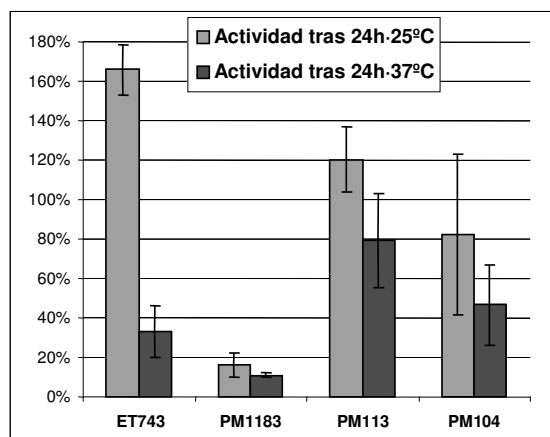


Figura 52. Cambios en la actividad de los compuestos tras un día de incubación a distintas temperaturas.

Con los cuatro ligandos hay disminución de la capacidad de unión a ADN tras incubación 24 horas a 37 °C, empleando TAE 2X como medio. Esta pérdida de actividad aumenta con el tiempo y la temperatura. Tras 24 horas a 25 °C, ET743 y PM113 conservan el 100% de su actividad (e incluso ganan, aunque no se ha encontrado una posible explicación para este hecho que ha resultado ser muy reproducible), mientras que PM104 pierde como media el 20% y PM1183 más del 85% de su capacidad aparente de unión a ADN.

Sin embargo, al incubar durante 24 horas a 37 °C, la actividad residual de PM113 y PM104 disminuyen aproximadamente hasta un 20% y 50%, respectivamente y ET743 y PM1183, al 30% y 10%. De hecho, PM1183, sufre una pérdida de actividad tan marcada que no se llega a alcanzar C_{50} a las concentraciones empleadas. Por este motivo, se emplea la C_{20} para poder comparar las actividades.

La relativa variabilidad observada en los diferentes experimentos de PM113 y PM104 pueden tener su base en una cinética no lineal del proceso que cause la pérdida de actividad o bien en el posible error introducido por el análisis bifásico, ya que la separación de las dos fases es menos notable con estos dos compuestos (fig. 53.B).

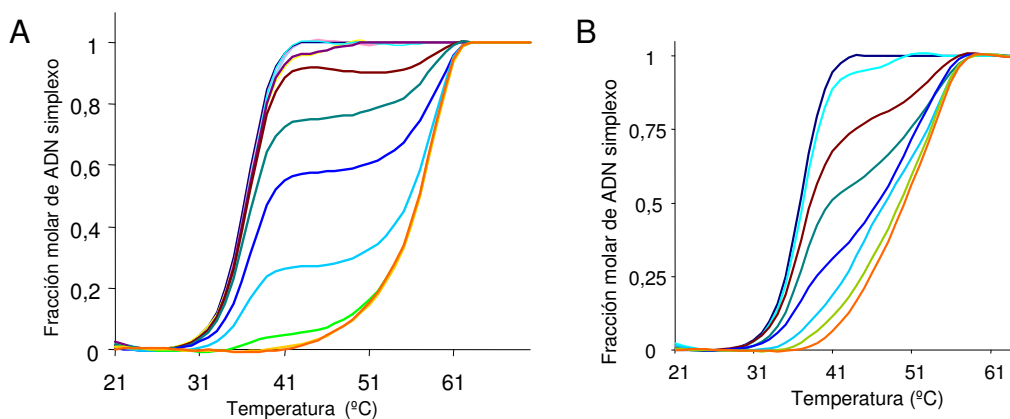


Figura 53. Ejemplo de un experimento de fusión. **A:** Curvas de un experimento con ET743 incubado 15 minutos con el oligonucleótido AgC. **B:** Curvas de un experimento de fusión de PM113 incubado 15 minutos con AgC. La concentración de ligando aumenta de izquierda a derecha.

Tras incubar los cuatro compuestos 24 horas empleando exclusivamente DMSO como medio se observa que la actividad es la misma que con compuesto sin incubar, con excepción de PM113. Por lo tanto, sólo parece haber degradación en medio acuoso para PM104, PM1183 y ET743. En el caso de PM113, se produce una degradación idéntica a la que ocurría al incubar a 37 °C, obteniéndose de nuevo una disminución de la actividad del 50%.

Tabla 10. C_{50} obtenidas tras 24 horas de preincubación a 37 °C en DMSO.

Compuesto	C_{50} (μ M)
	24h·37°C pre-AND en DMSO
ET743	1,6
PM1183 (C_{20})*	3,51
PM113	1,17
PM104	0,99

*: Para PM1183 se calcula la C_{20} con el fin de comparar con los datos obtenidos en TAE 2X, aunque en DMSO sí se alcanza C_{50} .

Se ha comprobado que, una vez formados los complejos, no hay diferencias significativas de estabilidad (ΔT_m , ver figura 54), independientemente del tiempo y temperatura de incubación o de si hay pérdida de la actividad, por tanto, los complejos formados son iguales independientemente de las condiciones de incubación.

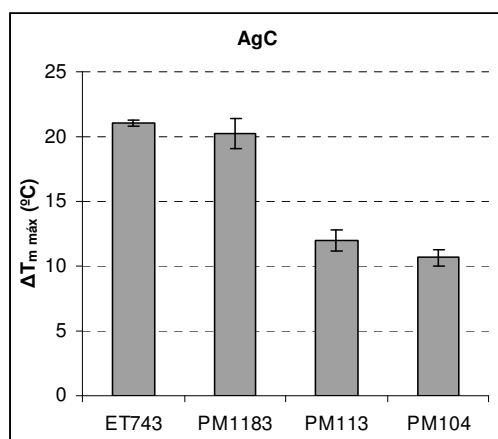


Figura 54. Aumentos de temperatura de fusión del oligonucleótido AgC con los ligandos que se indican.

Se desconoce el fenómeno físico o químico que da lugar a esta pérdida de actividad. Posibles causas podrían ser una alteración química de la molécula, una reacción que produzca dimerización o multimerización, e incluso simple precipitación o adhesión a las paredes de los tubos. En concreto, en el caso de ET743, tras las incubaciones aparece una coloración amarillenta en las disoluciones de mayor concentración.

En cualquier caso, si se tratase de un proceso químico, como degradación, se debe tener en cuenta que el principio farmacológicamente activo podría ser un producto de este proceso. En ese caso, su mecanismo de acción no sería a través de interacción con ADN. Por otra parte, habría que considerar que PM1183 es el que sufre mayor pérdida de su capacidad de unión al ADN (extrema tanto a 25 como a 37 °C) ya que es el compuesto que parece unirse más débilmente al ADN, pero esto podría deberse precisamente a la disminución de su concentración efectiva.

La aplicación del ensayo basado en el análisis de curvas de fusión para estudios de estabilidad es algo novedoso. De esta manera, hemos podido comprobar que en los experimentos con incubaciones largas que se llevan a cabo con estos cuatro compuestos en presencia de ADN se están produciendo dos procesos simultáneos y aparentemente relacionados: uno es la unión al ADN y el otro, una aparente alteración de los ligandos. La cuantificación de la actividad o capacidad de unión de estos ligandos al ADN mediante el parámetro C_{50} puede no ser muy precisa, sin embargo, sucesivas repeticiones de los experimentos han probado que se trata de un procedimiento robusto y reproducible. Las variaciones detectadas entre distintos experimentos no se deben a imprecisiones del método. De hecho, la posibilidad de desarrollar este ensayo de forma rápida y miniaturizada es lo que ha hecho posible obtener este tipo de resultados.

2.2.4. Aplicación a compuestos con unión compleja al ADN

En apartados anteriores se ha mostrado que este método permite estudiar la interacción de ligandos de forma casi independiente de su modo de unión al ADN, con la excepción de agentes alquilantes que unen entre sí las dos hebras del ADN de modo irreversible (*cross-linkers*), como la mitomicina C o el cis-platino.

En este apartado se muestra que el método permite también caracterizar la preferencia de unión a cadena doble o cadena sencilla, así como obtener evidencias de unión mediante mecanismos complejos.

AMP-10.15

Como se ha explicado anteriormente, dentro del grupo se han sintetizado diversas series de compuestos catiónicos heteroaromáticos con un nitrógeno cuaternario en posición cabeza de puente. A partir de 1-metil- γ -carbolina se obtuvo la bis-sal denominada AMP-10.15. Anteriores estudios con este compuesto por viscosimetría permitieron determinar su comportamiento mono- o bis-intercalante, dependiendo de la concentración. Al estudiar este compuesto mediante este método se consiguió distinguir sus diferentes tipos de interacción con ADN, debido a la aparición de curvas de fusión bifásicas con aumento de temperatura de fusión en cada una de las dos fases (ver figura 55). Por tanto, la primera fase no corresponde a la fusión del ADN libre, sino al complejo menos estable de los dos formados.

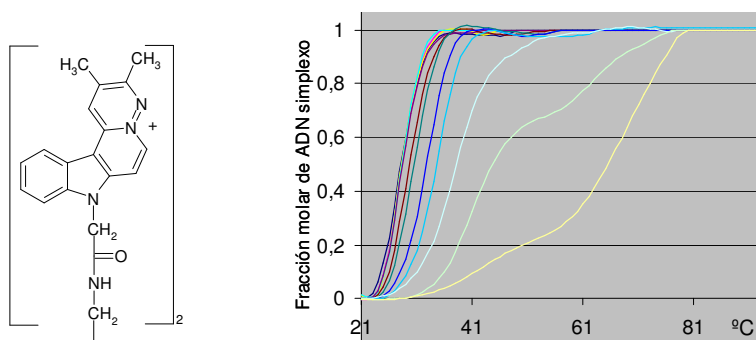


Figura 55. Estructura química del AMP-10.15 y ejemplo de curvas de fusión del oligonucleótido AT y concentraciones crecientes de este compuesto.

En concreto, se ha podido comprobar que el método también permite discriminar entre la unión mono- y bis-intercalativa (monointercalante a bajas concentraciones y bis-intercalante a concentraciones más elevadas de AMP-10.15, según resultados del grupo

no publicados). Con ello, podemos inferir que el aumento de temperatura de fusión que se produce en la primera fase de las curvas de disociación (fig. 55) corresponde a la unión monointercalativa (menos estable) y la segunda fase, a la bisintercalación, que es una unión más estable que la primera, lo cual concuerda con el mayor aumento de T_m .

S23906-1

El compuesto S23906-1 (cis-1,2-diacetoxi-1,2-dihidrobenczo[b]acronicina, figura 57) es un derivado sintético (Laboratorios Servier) del alcaloide natural acronicina, aislada en 1948 de la corteza del arbusto australiano *Acronychia baueri* [279]. Es un agente alquilante que reacciona con el grupo exocíclico 2-NH₂ de las guaninas, formando aductos muy estables [280] y ocasionando roturas de la doble hebra de ADN (DSB, *double-strand breaks*) [281]. Inhibe la síntesis de ADN conduciendo a apoptosis [282, 283]. Presenta gran interés como antitumoral por su amplio espectro (frente a leucemia, melanoma, cáncer de pulmón, ovario o colorrectal [284], [285]). Se encuentra actualmente en ensayos clínicos en fase II [286].

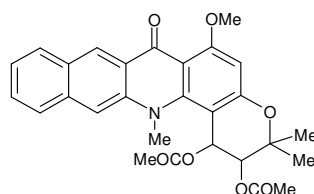


Figura 56. Estructura química del compuesto S23906-1.

A diferencia de todos los demás compuestos que se han estudiado en esta Tesis, su unión al ADN ocasiona la desestabilización del dúplex [278], uniéndose a cadena sencilla, lo cual se debería ver reflejado en una disminución en su temperatura de fusión, que aumentará con la concentración del compuesto. Sin embargo, mediante nuestro método pudimos observar como el hecho de que se produzca una desestabilización ($\Delta T_m < 0$) o estabilización ($\Delta T_m > 0$) del dúplex parece ser dependiente de la secuencia del unión de este ligando (figura 57).

Su comportamiento con los oligonucleótidos AT y GC indica una evidente preferencia por sitios GC, como había sido demostrado por otras metodologías [278], lo cual contribuye a la validación de nuestro método para su aplicación al estudio de la interacción de compuestos con unión a cadena sencilla. Un estudio más profundo frente a los diferentes sitios formados por una G y/o una C (G/C, CpG, GpC y CpC/GpG)

mostró que el mejor sitio de unión es GpC. Con los demás sitios no se observó ningún cambio en la temperatura de fusión (T_m), ni siquiera a la máxima concentración de S23906-1 (20 μ M). Además, para poder observar cambios de T_m es necesario que haya al menos dos GpC (dúplex AgC2D, que coincide con los resultados obtenidos con gCgT); con un solo GpC apenas se detectan cambios. Sin embargo, dos GpC seguidos tampoco parecen ser sitios favorables (oligonucleótido AgC2r).

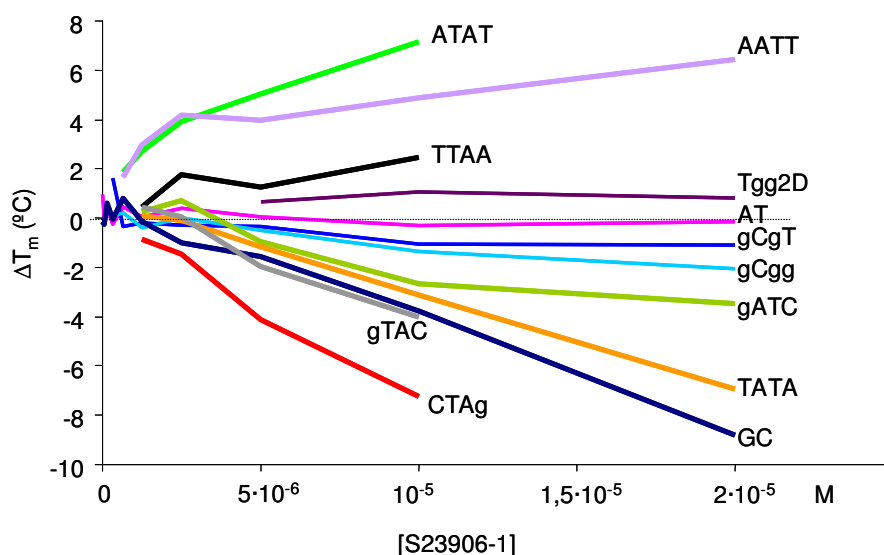


Figura 57. Variación de la temperatura de fusión (ΔT_m) con la concentración de S23906-1. Sólo se representan aquellas secuencias que han dado algún cambio de T_m . Con algunos dúplex no se registra una curva de fusión a elevadas concentraciones de ligando.

A la vista de los resultados obtenidos con los dúplex ggC (que es tan desfavorable como el oligonucleótido AT, que es el peor), CCgCgg y CggCgg, parece que la presencia de una G o C delante de un sitio GpC hace que éste pase de sitio favorable a desfavorable. El hecho de que CTAg sea más desestabilizado que GC se corresponde con lo esperado, ya que contiene dos sitios GpC más. El oligonucleótido gTAC contiene el mismo sitio GpCpGpT que hay en GC (tabla 17), que no está presente en los demás oligonucleótidos de este segundo juego; sin embargo, podría ser que la presencia de una adenina a continuación permita que se una otra molécula de S23906-1.

Las secuencias cuya unión estabiliza este compuesto son sobre todo ATAT y AATT, aunque también TTAA y Tgg2D. Sin embargo, con TATA (tabla 18) se obtienen unos resultados parecidos al oligonucleótido GC, es decir, se produce estabilización del dúplex ($\Delta T_m > 0$).

Tabla 17. Secuencia y resumen de resultados obtenidos en los experimentos de fusión de los oligonucleótidos indicados y el compuesto S23906-1.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	ΔT_m mín
GC	GCG CGG CGT CCG GGC C	$\approx -10^\circ\text{C}$
gCgg	AAT ATA AAG CGG TAA ATT AA	$\approx -2^\circ\text{C}$
gCgT	AAT ATA AAG CGT TAA ATT AA	$\approx -1^\circ\text{C}$
AgC2D	AAT ATA AAG CAG CAA ATT AA	$\approx -1^\circ\text{C}$
CTAg-F	GCG CGG CGC TAG CCG GGC C	ΔT_m mín < GC
gTAC-F	GCG CGG CGT ACC GGG CC	Cercano a los de GC
gATC-F	GCG CGG CGA TCC GGG CC	Cercano a los de GC

Tabla 18. Resumen de resultados conseguidos con las secuencias TATA, AATT, TTAA y ATAT y S23906-1.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	ΔT_m mín
TATA-F	GCG CGG CTATAC GGG CC	Desestabiliza
AATT-F	GCG CGG CAATTC GGG CC	Estabiliza
TTAA-F	GCG CGG CTTAAC GGG CC	Estabiliza
ATAT-F	GCG CGG CATATC GGG CC	Estabiliza

A continuación, se resumen en forma de tabla (tabla 19) los resultados obtenidos con los oligonucleótidos con los que ha observado una menos alteración de la temperatura de fusión en presencia del compuesto S23906-1, así como sus secuencias.

Tabla 19. Oligonucleótidos con los cuales la unión de S23906-1 causa un efecto menos destacable.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	ΔT_m mín
AgC2r	AAT ATA AAG CGC TAA ATT AA	Débil. ΔT_m mín $\approx -0.5^\circ\text{C}$
Cgg	AAT ATA AAC GGA AAT TAA	Débil. ΔT_m mín $\approx -0.5^\circ\text{C}$
2SJ	AAT ATA CgT TCg ATT AA	Débil
2SS	AAT ATA CgT AAT ATC gAT TAA	Muy débil
Tgg2r	AAT ATA AAC CAT GGA AAT TAA	Muy débil
Tgg2d	AAT ATA AAC CAC CAA ATT AA	Estabiliza ligeramente
AgC	AAT ATA AAG CAA ATT AA	Muy débil
Tgg	AAT ATA AAC CAA ATT AA	Muy débil
AgA	AAT ATA AAG AAA TTA A	Muy débil
CgA	AAT ATA AAC gAA ATT AA	Muy débil
CCgCgg	AAT ATA AAC CGC GGA AAT TAA	Muy débil
CggCgg	AAT ATA AAC gGC GGA AAT TAA	Muy débil
CCgg	AAT ATA AAC CgG TAA ATT AA	Muy débil
TCgA	AAT ATA AAT CgA TAA ATT AA	Muy débil
ACgT	AAT ATA AAA CgT TAA ATT AA	Muy débil
ggC	AAT ATA AAG GCA AAT TAA	No se detecta efecto
AT	CAA TTA AAT ATA AC	No se detecta efecto

No se profundizó más en la caracterización de la unión de este compuesto al ADN ya que el bajo efecto (ΔT_m) observado incluso a altas concentraciones, podría incluso indicar que su mecanismo de acción *in vivo* no conlleve al ADN como diana.

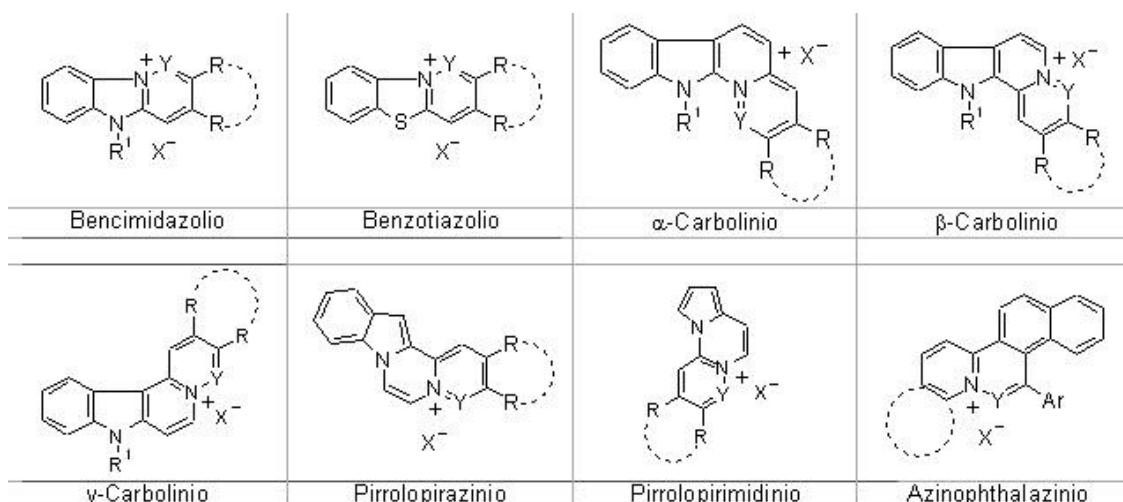


Figura 58. Series de cationes de tipo quinolizinio y aza-quinolizinio con actividad antiproliferativa

Las series estudiadas tienen potencialidad intercalante de ADN debido a su estructura policíclica, aromática, plana y cargada. Para todos ellos se ha estudiado, en primer lugar, si se unen al ADN y, si la unión tiene lugar, se determina si esta es por intercalación. Los compuestos intercalantes de ADN se han sometido todos ellos a un estudio sobre la preferencia de secuencia de unión, analizándose las diferencias de comportamiento frente a AT y GC.

Se han llevado a cabo dos estrategias para la caracterización de la unión de estas series de compuestos:

1. En un principio, la estrategia consistía en realizar estudios sistemáticos de titulación de todos los compuestos con plásmido bacteriano en gel de electroforesis. Si a determinada concentración del ligando se produce un retraso en la banda de plásmido relajado, indicativo de una relajación de dicho plásmido causada por la unión del compuesto (ver figura 59), se puede concluir que el compuesto es intercalante de ADN. Para aquellos ligandos que no muestran una clara unión intercalante mediante este ensayo, aplicamos un segundo tipo de experimento. En este caso se realizan dos geles, uno de ellos incluyendo al propio compuesto a alta concentración en su composición y cargando en cada gel esa alta concentración del ligando más plásmido relajado (en un pocillo) y plásmido superenrollado (en otro segundo pocillo). Si tras la electroforesis se observa un superenrollamiento (positivo) del plásmido relajado y/o relajación del superenrollado (figura 59), el compuesto es intercalante. A continuación, se lleva a cabo el análisis del

comportamiento de estos ligandos al unirse a los oligonucleótidos AT y GC, mediante el estudio de curvas de fusión.

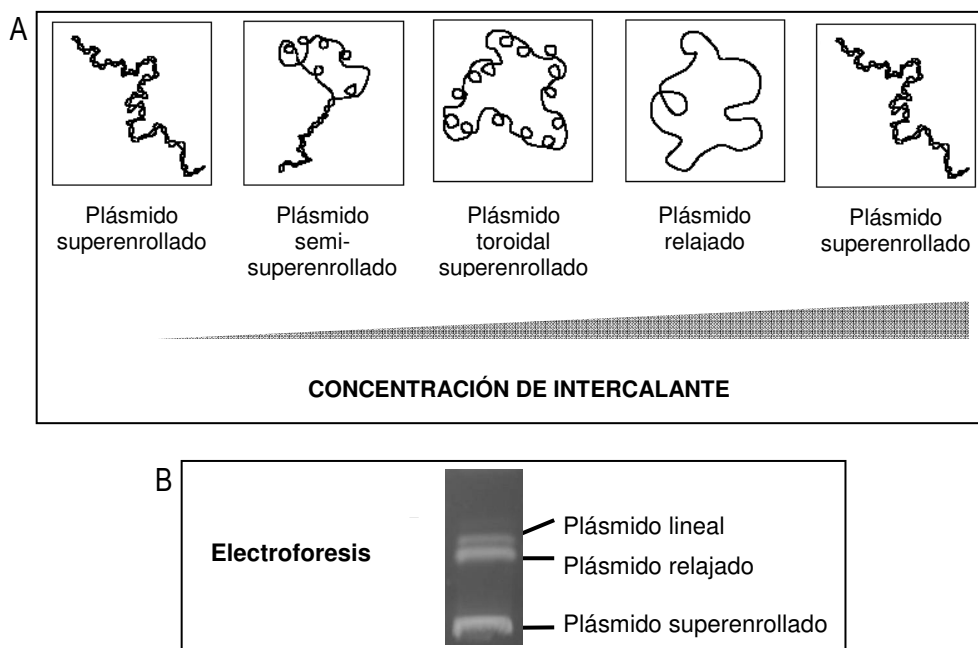


Figura 59. Diferentes topoisómeros del plásmido, **A:** en relación con la concentración de intercalante. **B:** En electroforesis en gel se separan en base a su grado de compactación.

- Una vez desarrollado el método basado en el análisis de curvas de fusión y a la vista de las ventajas que presenta, como el bajo consumo de reactivos y tiempo, se pasó a su empleo para todos los nuevos compuestos sintetizados. Todos aquellos que causan un aumento de temperatura de fusión de los oligonucleótidos AT y/o GC se unen al ADN y son posibles intercalantes, por lo que, a continuación, se realizan los ensayos de intercalación de plásmido en gel de electroforesis, descartando a aquellos que no se unen.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para cada compuesto de estas series, en forma de ficha.

3.1. Cromóforos derivados de bencimidazol y benzotiazol

En la primera de las series, el cromóforo **A** tomado como referencia de esta serie, fue obtenido a partir de bencimidazol. La modificación del tamaño de éste, la forma, la sustitución del nitrógeno azólico por azufre y la sustitución del cromóforo generó una serie de 14 análogos obtenidos todos ellos por condensación de Westphal entre la correspondiente sal de azolio y la dicetona apropiada (figura 60).

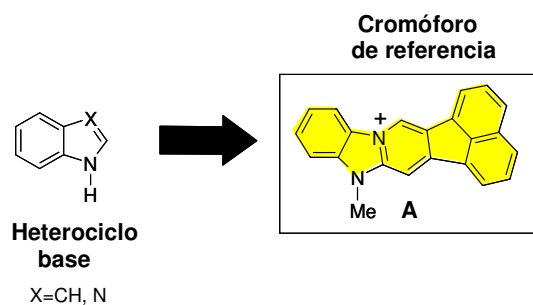


Figura 60. Heterociclo base y cromóforo de referencia de la serie de benzoazolio.

Todos los compuestos de esta serie se detallan en la tabla siguiente.

Tabla 11. Estructura de los compuestos derivados de benzoazolio (no se indican los contraiones).

EBM-007	JSH-68	JPF-T-Me	JSH-7.39
JSH-7.14	EBM-913	JSH-63	JSH-7.38
JSH-7.55	JSH-7.51	JSH-7.52	JSH-7.54
JSH-6.47			

En las páginas siguientes se muestran y discuten los resultados obtenidos, organizados a modo de fichas para cada compuesto.

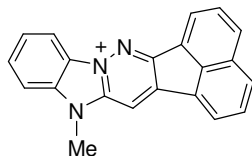
Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que los cromóforos tipo bencimidazolio que incorporan el sistema de fenantreno en su estructura (JSH-7.14, JSH-7.38, JSH-7.55, JSH-7.51, JSH-7.52 y JSH-7.54) presentan, en general, mayor capacidad de unión al ADN que aquellos otros cromóforos que o bien no lo incorporan (EBM-007) o la fusión con la parte catiónica se produce con el sistema de acenafteno (JPF-T-Me, JSH-63, JSH-68, JSH-7.39 y JSH-6.47) y perileno (EBM-913). Por tanto, parece que el grupo fenantreno confiere una mayor capacidad de interacción con ADN.

La presencia de sustituyentes metilo y metoxilo en los cromóforos tipo benzotiazolio (JSH-7.55, JSH-7.51, JSH-7.52) le confiere al cromóforo una mayor afinidad por el ADN, como lo demuestra el aumento de estabilización (ΔT_m) de dichos compuestos, frente al cromóforo no sustituido (JSH-7.38). La estabilización de los complejos formados por estos tres compuestos es extraordinariamente grande, llegando a alcanzar incrementos en la temperatura de fusión (ΔT_m) de hasta 60 °C. Con JSH-7.54, que está sustituido por flúor en la posición 2, se alcanza un ΔT_m de 50 °C.

La mayoría de los cromóforos de esta serie que se unen al ADN lo hacen con preferencia por AT, puesto que son capaces de estabilizar esta secuencia en mucha mayor medida y con menores concentraciones que para el oligonucleótido GC. El único compuesto que causa mayor efecto al unirse a GC (mayor ΔT_m) a menores concentraciones que a AT y por tanto presenta preferencia por GC es JSH-68, que difiere del cromóforo de referencia en la fusión del anillo bencénico y el imidazolio.

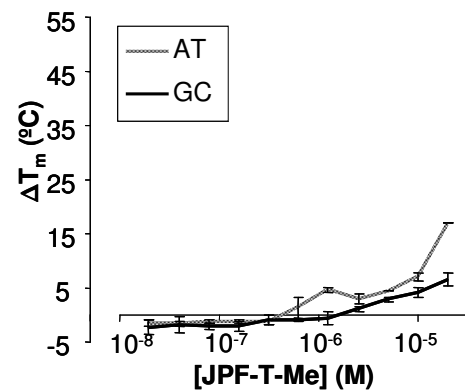
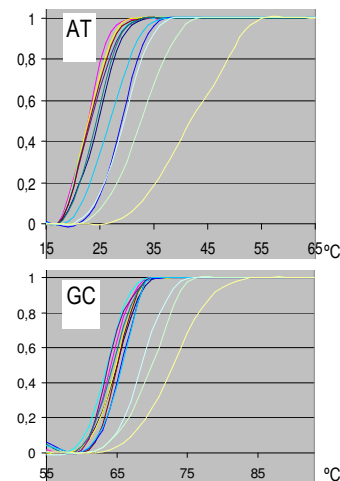
FICHAS CROMÓFOROS DERIVADOS DE BENCIMIDAZOL Y BENZOTIAZOL

JPF-T-Me



Ensayo de relajación de plásmido en gel
Capacidad intercalante probada [288].

Ensayo de fusión



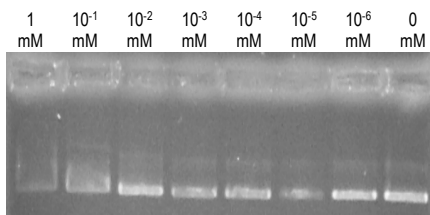
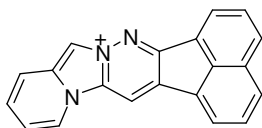
Incremento de temperatura de fusión (*melting*) con el aumento de concentración en las curvas de disociación obtenidas en TAE 2X.

Concentraciones de ligando: 0, $1.95 \cdot 10^{-8}$, $3.91 \cdot 10^{-8}$, $7.81 \cdot 10^{-8}$, $1.56 \cdot 10^{-7}$, $3.13 \cdot 10^{-7}$, $6.25 \cdot 10^{-7}$, $1.25 \cdot 10^{-6}$, $2.5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-5}$ y $2 \cdot 10^{-5}$ M (de izquierda a derecha).

Interpretación de resultados

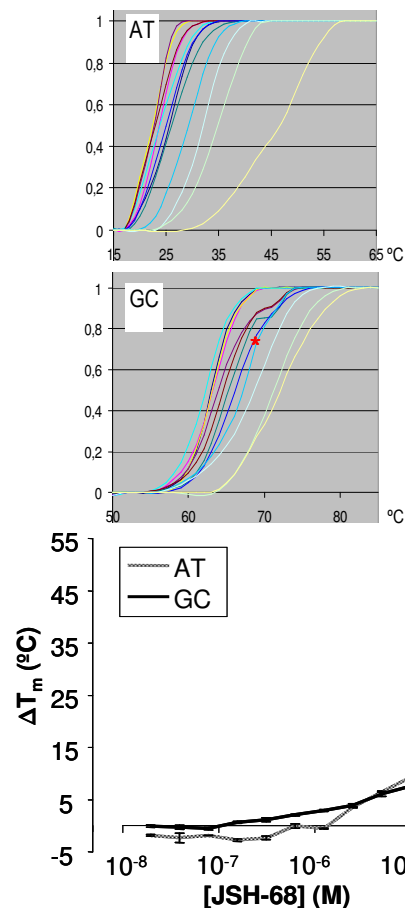
Intercalante con unión poco estable a los oligonucleótidos AT y GC. Se une preferentemente a AT.

JSH-68



Ensayo de relajación de plásmido en gel

Ensayo de fusión



Incremento de temperatura de fusión (*melting*) con el aumento de concentración en las curvas de disociación obtenidas en TAE 2X.

Concentraciones de ligando: 0 , $1.95 \cdot 10^{-8}$, $3.91 \cdot 10^{-8}$, $7.81 \cdot 10^{-8}$, $1.56 \cdot 10^{-7}$, $3.13 \cdot 10^{-7}$, $6.25 \cdot 10^{-6}$, $1.25 \cdot 10^{-4}$, $2.5 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-5}$ y $2 \cdot 10^{-5}$ M (de izquierda a derecha).

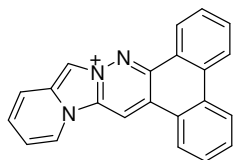
* = picos de fluorescencia producidos por un fallo de lectura en el termociclador.

Interpretación de resultados

Intercalante.

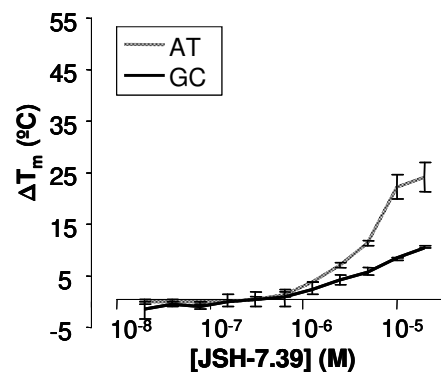
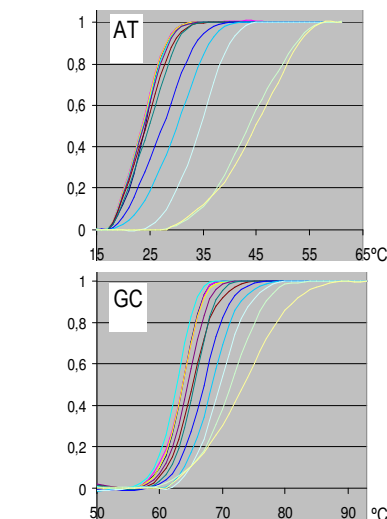
Se une tanto a AT como a GC, de manera similar y con poca estabilidad. Ligera preferencia por GC.

JSH-7.39



Ensayo de relajación de plásmido en gel
Capacidad intercalante probada [288].

Ensayo de fusión



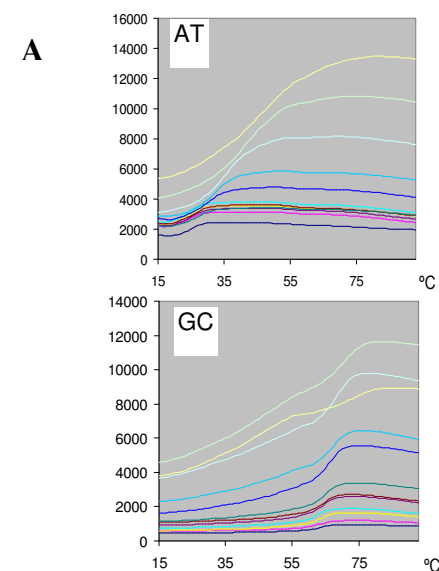
Incremento de temperatura de fusión (*melting*) con el aumento de concentración en las curvas de disociación obtenidas en TAE 2X.

Concentraciones de ligando: 0, $1.95 \cdot 10^{-8}$, $3.91 \cdot 10^{-8}$, $7.81 \cdot 10^{-8}$, $1.56 \cdot 10^{-7}$, $3.13 \cdot 10^{-7}$, $6.25 \cdot 10^{-6}$, $1.25 \cdot 10^{-4}$, $2.5 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-5}$ y $2 \cdot 10^{-5}$ M (de izquierda a derecha).

Interpretación de resultados

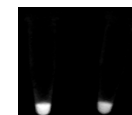
Intercalante con unión preferente al oligonucleótido AT.

Presenta una gran fluorescencia cuando está unido a ADN, como se puede observar (A) en las curvas de fluorescencia sin tratar de FAM frente a la temperatura y (B) en la propia disolución de compuesto iluminada con luz UV, con y sin ADN:



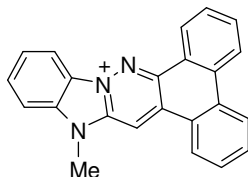
Al aumentar la concentración de ligando (de abajo a arriba), lo hace la fluorescencia de las curvas.

B



Fotografía de disoluciones de JSH-7.39 en presencia (izda.) y ausencia (dcha.) de ADN.

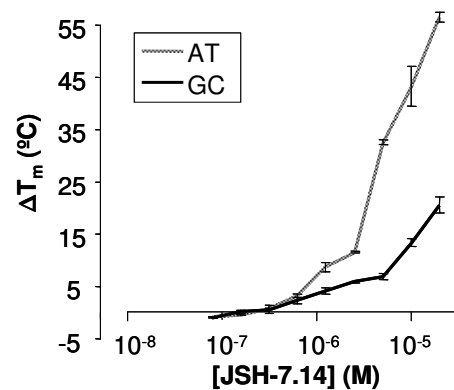
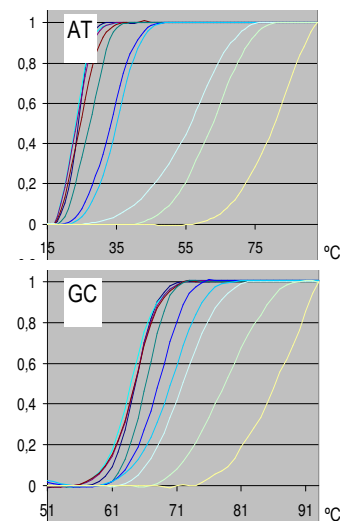
JSH-7.14



Ensayo de relajación de plásmido en gel

Capacidad intercalante probada [288].

Ensayo de fusión



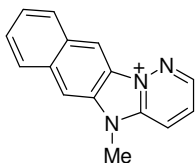
Incremento de temperatura de fusión (*melting*) con el aumento de concentración en las curvas de disociación obtenidas en TAE 2X.

Concentraciones de ligando: 0, $1.95 \cdot 10^{-8}$, $3.91 \cdot 10^{-8}$, $7.81 \cdot 10^{-8}$, $1.56 \cdot 10^{-7}$, $3.13 \cdot 10^{-7}$, $6.25 \cdot 10^{-7}$, $1.25 \cdot 10^{-6}$, $2.5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-5}$ y $2 \cdot 10^{-5}$ M (de izquierda a derecha).

Interpretación de resultados

Se alcanza una estabilización muy alta tanto con AT como con GC. En concreto, el incremento máximo (a la mayor concentración de ligando) de temperatura de fusión con el oligonucleótido AT, por el que presenta preferencia, es de unos 55 °C, frente a unos 17 °C en el caso de JPF-T-Me.

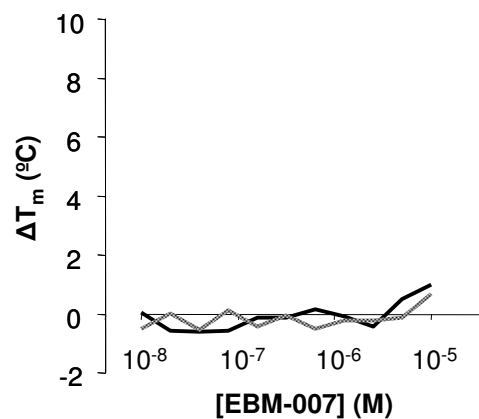
EBM-007



Ensayo de relajación de plásmido en gel

Capacidad intercalante probada [288].

Ensayo de fusión

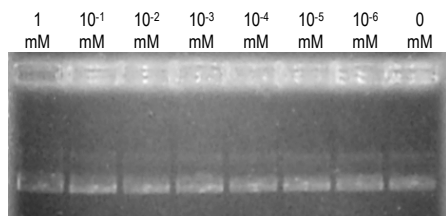
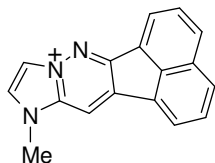


Incremento de temperatura de fusión (*melting*) con el aumento de concentración en las curvas de disociación obtenidas en TAE 2X.

Interpretación de resultados

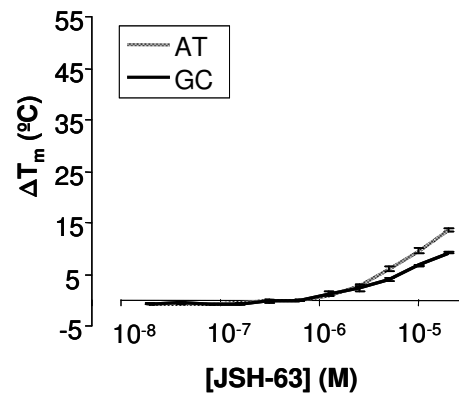
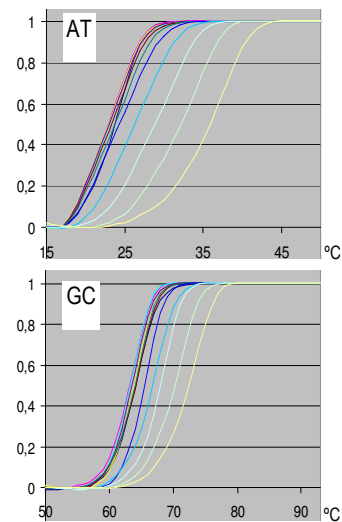
Unión al ADN casi inexistente (ΔT_m AT/GC = 0 °C, salvo a concentraciones muy elevadas).

JSH-63



Ensayo de relajación de plásmido en gel

Ensayo de fusión



Incremento de temperatura de fusión (*melting*) con el aumento de concentración en las curvas de disociación obtenidas en TAE 2X.

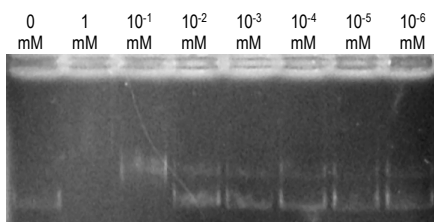
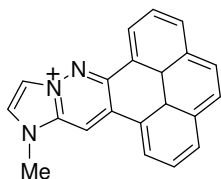
Concentraciones de ligando: 0 , $1,95 \cdot 10^{-8}$, $3,91 \cdot 10^{-8}$, $7,81 \cdot 10^{-8}$, $1,56 \cdot 10^{-7}$, $3,13 \cdot 10^{-7}$, $6,25 \cdot 10^{-7}$, $1,25 \cdot 10^{-6}$, $2,5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-5}$ y $2 \cdot 10^{-5}$ M (de izquierda a derecha).

Interpretación de resultados

No parece intercalar: no relaja plásmido.

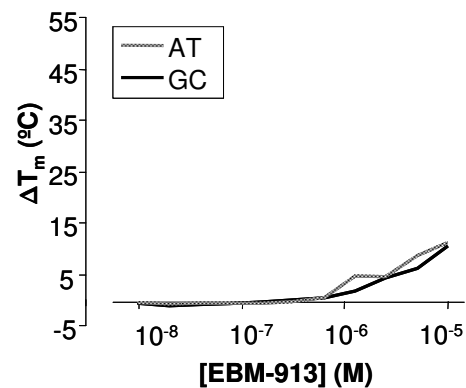
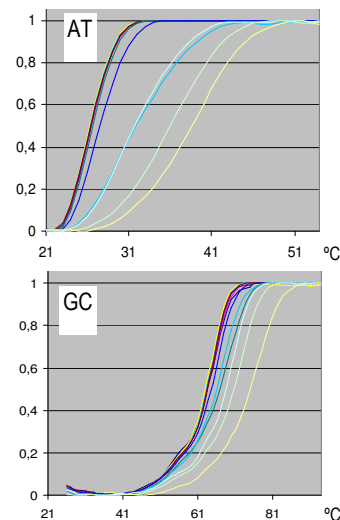
Unión débil ligeramente preferente por AT.

EBM-913



Ensayo de relajación de plásmido en gel

Ensayo de fusión



Incremento de temperatura de fusión (*melting*) con el aumento de concentración en las curvas de disociación obtenidas en TAE 2X.

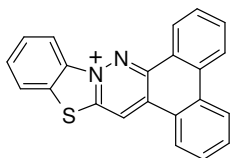
Concentraciones de ligando: 0 , $1,95 \cdot 10^{-8}$, $3,91 \cdot 10^{-8}$, $7,81 \cdot 10^{-8}$, $1,56 \cdot 10^{-7}$, $3,13 \cdot 10^{-7}$, $6,25 \cdot 10^{-7}$, $1,25 \cdot 10^{-6}$, $2,5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-5}$ y $2 \cdot 10^{-5}$ M (de izquierda a derecha).

Interpretación de resultados

Intercalante.

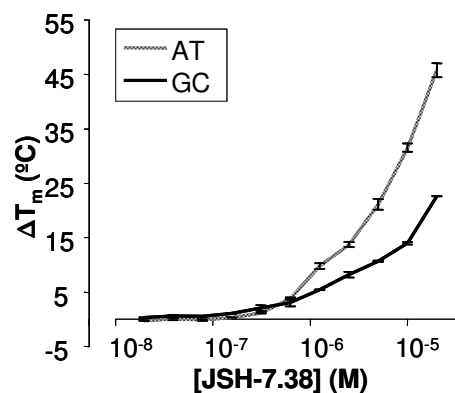
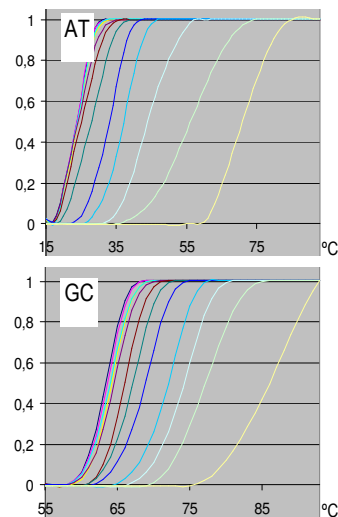
Se une por igual a AT y GC, formando un complejo no muy estable ($\Delta T_{m \text{ máx AT/GC}} = 12 \text{ }^{\circ}\text{C}$).

JSH-7.38



Ensayo de relajación de plásmido en gel
Capacidad intercalante probada [288].

Ensayo de fusión



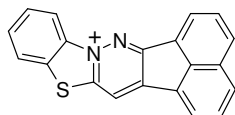
Incremento de temperatura de fusión (*melting*) con el aumento de concentración en las curvas de disociación obtenidas en TAE 2X.

Concentraciones de ligando: 0, $1.95 \cdot 10^{-8}$, $3.91 \cdot 10^{-8}$, $7.81 \cdot 10^{-8}$, $1.56 \cdot 10^{-7}$, $3.13 \cdot 10^{-7}$, $6.25 \cdot 10^{-7}$, $1.25 \cdot 10^{-6}$, $2.5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-5}$ y $2 \cdot 10^{-5}$ M (de izquierda a derecha).

Interpretación de resultados

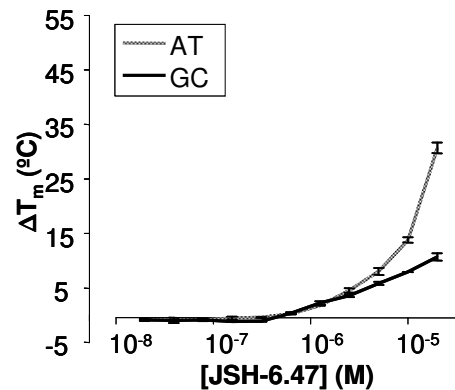
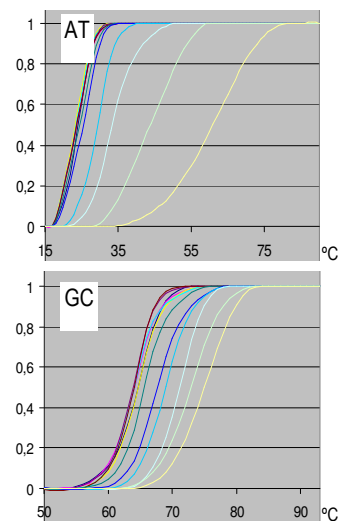
Intercalante con unión a GC ($\Delta T_{m \text{ GC}} \approx 23 \text{ } ^\circ\text{C}$) y preferente a AT, con notable estabilización ($\Delta T_{m \text{ AT}} \approx 45 \text{ } ^\circ\text{C}$).

JSH-6.47



Ensayo de relajación de plásmido en gel
Capacidad intercalante probada [288].

Ensayo de fusión



Incremento de temperatura de fusión (*melting*) con el aumento de concentración en las curvas de disociación obtenidas en TAE 2X.

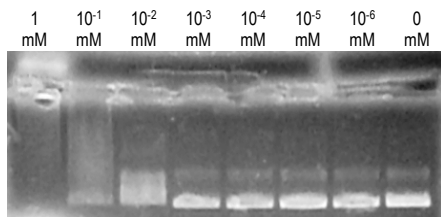
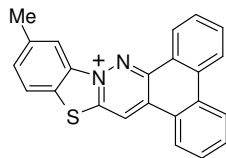
Concentraciones de ligando: 0 , $1.95 \cdot 10^{-8}$, $3.91 \cdot 10^{-8}$, $7.81 \cdot 10^{-8}$, $1.56 \cdot 10^{-7}$, $3.13 \cdot 10^{-7}$, $6.25 \cdot 10^{-6}$, $1.25 \cdot 10^{-4}$, $2.5 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-5}$ y $2 \cdot 10^{-5}$ M (de izquierda a derecha).

Interpretación de resultados

Intercalante.

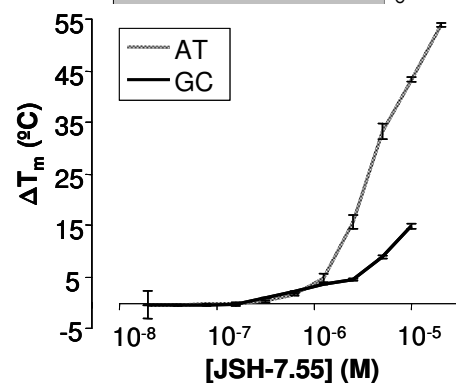
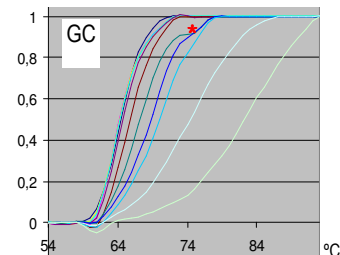
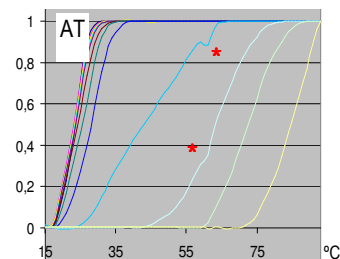
Se une a AT y GC, con preferencia por AT y produce, con ambas secuencias, complejos ligeramente más estables que JPF-T-Me.

JSH-7.55



Ensayo de relajación de plásmido en gel

Ensayo de fusión



Incremento de temperatura de fusión (*melting*) con el aumento de concentración en las curvas de disociación obtenidas en TAE 2X.

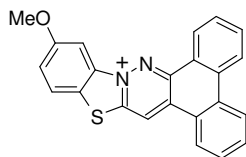
Concentraciones de ligando: 0, $1.95 \cdot 10^{-8}$, $3.91 \cdot 10^{-8}$, $7.81 \cdot 10^{-8}$, $1.56 \cdot 10^{-7}$, $3.13 \cdot 10^{-7}$, $6.25 \cdot 10^{-7}$, $1.25 \cdot 10^{-6}$, $2.5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-5}$ y $2 \cdot 10^{-5}$ M (de izquierda a derecha).

* = pico de fluorescencia producido por un fallo de lectura en el termociclador.

Interpretación de resultados

Es intercalante. Se une a GC y destaca su gran unión preferente a AT. De hecho, el cambio de pendiente que se produce con AT a $2.5 \cdot 10^{-4}$ M de JSH-7.55 sugiere un comportamiento casi bifásico.

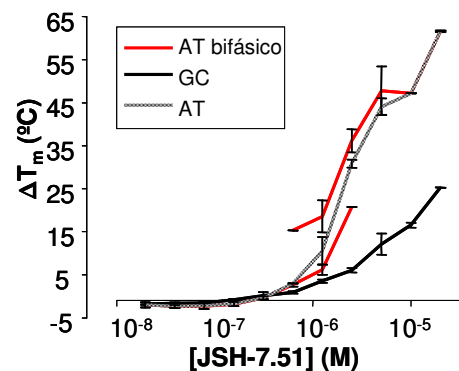
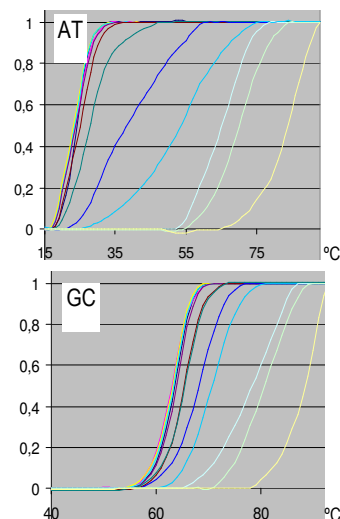
JSH-7.51



Ensayo de relajación de plásmido en gel

Capacidad intercalante probada [288].

Ensayo de fusión



Incremento de temperatura de fusión con la concentración de ligando en las curvas de disociación obtenidas en tampón fosfato potásico 20 mM. Se incluye el tratamiento bifásico de las curvas de AT (en rojo).

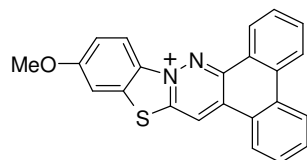
Concentraciones de ligando: 0, $1.95 \cdot 10^{-8}$, $3.91 \cdot 10^{-8}$, $7.81 \cdot 10^{-8}$, $1.56 \cdot 10^{-7}$, $3.13 \cdot 10^{-7}$, $6.25 \cdot 10^{-7}$, $1.25 \cdot 10^{-6}$, $2.5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-5}$ y $2 \cdot 10^{-5}$ M (de izquierda a derecha).

Interpretación de resultados

Intercalante.

Presenta unión preferente a AT, oligonucleótido que con este compuesto tiene curvas de fusión bifásicas y con destacable aumento de temperatura de fusión en la primera fase, lo que indica que la unión de este ligando a esta secuencia presenta más de un modo de interacción. La interacción más estable es la que se observa con la segunda fase, con la que se llega a alcanzar un ΔT_m AT de unos 60 °C.

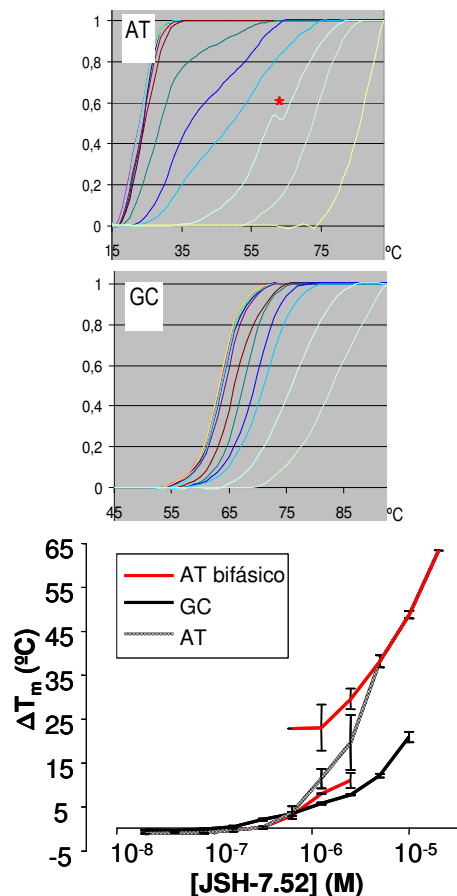
JSH-7.52



Ensayo de relajación de plásmido en gel

Capacidad intercalante probada [288].

Ensayo de fusión



Incremento de temperatura de fusión con la concentración de ligando en las curvas de disociación obtenidas en tampón fosfato potásico 20 mM. Se incluye el tratamiento bifásico de las curvas de AT (en rojo).

Concentraciones de ligando: 0 , $1.95 \cdot 10^{-8}$, $3.91 \cdot 10^{-8}$, $7.81 \cdot 10^{-8}$, $1.56 \cdot 10^{-7}$, $3.13 \cdot 10^{-7}$, $6.25 \cdot 10^{-6}$, $1.25 \cdot 10^{-4}$, $2.5 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-5}$ y $2 \cdot 10^{-5}$ M (de izquierda a derecha).

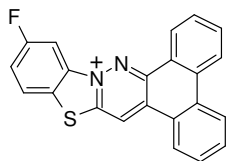
* = pico de fluorescencia producido por un fallo de lectura en el termociclador.

Interpretación de resultados

Intercalante.

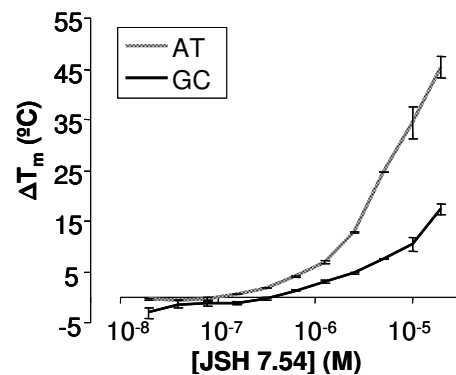
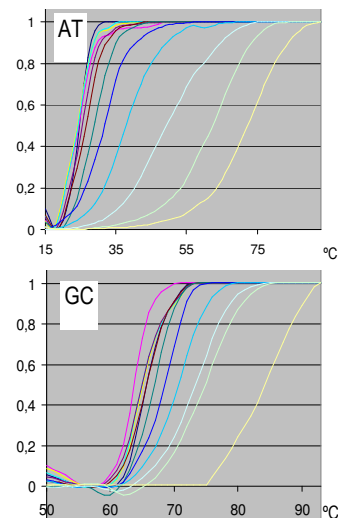
Unión preferente a AT, aunque se une también a GC. Las curvas de AT son bifásicas, debido a la lenta cinética del proceso de unión de ambos. Además, dado que se produce incremento de temperatura de fusión (ΔT_m) de ambas fases, parece que se trata de una interacción compleja.

JSH-7.54



Ensayo de relajación de plásmido en gel
Capacidad intercalante probada [288].

Ensayo de fusión



Incremento de temperatura de fusión (*melting*) con el aumento de concentración en las curvas de disociación obtenidas en TAE 2X.

Concentraciones de ligando: 0 , $1.95 \cdot 10^{-8}$, $3.91 \cdot 10^{-8}$, $7.81 \cdot 10^{-8}$, $1.56 \cdot 10^{-7}$, $3.13 \cdot 10^{-7}$, $6.25 \cdot 10^{-7}$, $1.25 \cdot 10^{-6}$, $2.5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-5}$ y $2 \cdot 10^{-5}$ M (de izquierda a derecha).

Interpretación de resultados

Intercalante.

Unión tanto a AT como a GC, con preferencia por AT.

3.2. Cromóforos derivados de carbolina

En la serie obtenida a partir de carbolinas el cromóforo de referencia **B** ha sido preparado a partir del sistema de β -carbolina (figura 61). Las posibilidades de variación estructural en este caso son menores.

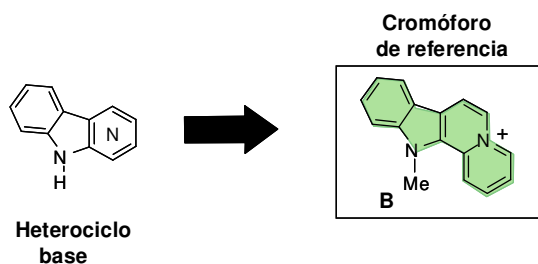


Figura 61. Heterociclo base y cromóforo de referencia de las serie de carbolinio.

Tabla 12. Compuestos que forman esta serie y su fórmula (no se indican los contraiones).

PVL-41	EBM-T9	PVL-27	PVL-32
PVL-18	PVL335	PVL-23	PVL321
PVL306	PVL306	EBM-T78d	EBM-218
APC-65	PVL80		

En este caso los cromóforos derivados de α - y β -carbolina han mostrado ser inestables en disolución por lo que su estudio exige la preparación de disoluciones frescas en el momento de realizar las determinaciones experimentales. En ocasiones, esto ha resultado un problema por la imposibilidad de disponer de suficiente cantidad de compuesto sólido, por lo que algunos experimentos no pudieron ser completados.

Hay muy poca o nula interacción de estos derivados de α - y β -carbolinas con secuencias ricas en GC, como se demuestra por la baja modificación que causan en la fusión de este oligonucleótido (pequeño ΔT_m), incluso a concentraciones saturantes de los ligandos. Destaca, sin embargo, la fuerte unión a AT (con curvas de fusión bifásicas) de EBM-T9 y PVL-335.

Por el moderado cambio en la temperatura de fusión, tanto del oligonucleótido AT como del GC, ligandos que presentan interacción débil-media son PVL-23 y EBM-T78d.

La naturaleza de los sustituyentes presentes en algunos de los compuestos de esta serie parece tener gran importancia en relación con su capacidad de interaccionar con el ADN. Por ejemplo, la unión de EBM-T78d (con dos metilos como sustituyentes) es mucho menos estable con AT que la del compuesto con etilos como sustituyentes (EBM-T9) y sin embargo, con EBM-T78d se observa más interacción con la secuencia rica en GCs.

Los cromóforos derivados de γ -carbolinio (PVL-80 y APC-65) se unen a ADN de forma débil (bajo ΔT_m , más aún en el caso de PVL-80, que no tiene los tres sustituyentes metilos como APC-65) y aparentemente sin selectividad de secuencia ya que presentan un comportamiento muy similar con la secuencia rica en ATs que con la rica en GCs.

A continuación se detallan y discuten los resultados obtenidos con cada uno de los cromóforos derivados de α -, β - y γ -carbolinio de esta serie como fichas individuales para cada compuesto.

FICHAS CROMÓFOROS DERIVADOS DE CARBOLINA

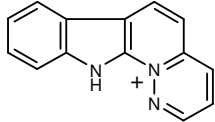
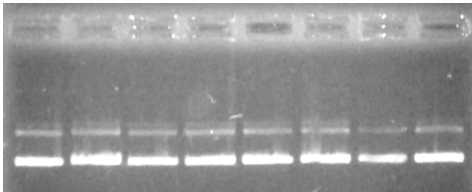
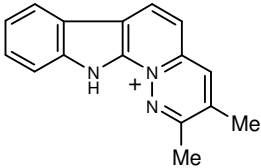
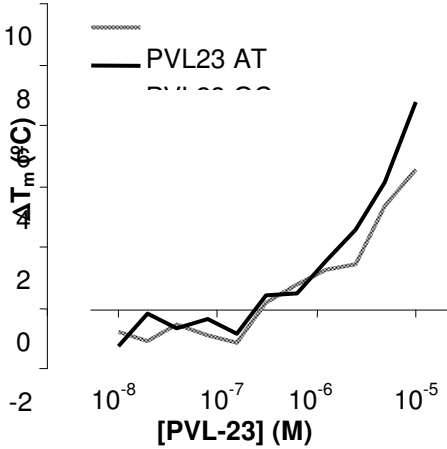
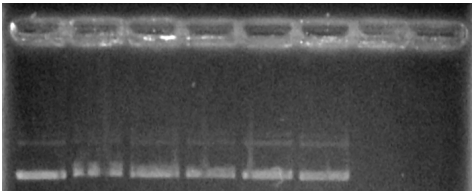
α-Carbolinas			
Compuesto y fórmula	Ensayo de fusión	Ensayo de intercalación	Resultados
PVL-27 	<p>No se pudieron hacer los ensayos de fusión ensayos por la inestabilidad de estos compuestos en disolución.</p>		<p>No parece intercalar (No relaja plásmido S-).</p>
PVL-23 			<p>Posible intercalante ya que parece relajar plásmido S-, aunque de forma no muy patente.</p> <p>Se une tanto a AT como a GC, con pocas diferencias ($\Delta T_m \text{ máx AT} \approx 5^\circ\text{C}$; $\Delta T_m \text{ máx GC} \approx 7^\circ\text{C}$).</p> <p>En cualquier caso, no produce una gran estabilización de la doble hebra, aunque de esta serie es el compuesto con mayor interacción con ADN.</p>

Tabla 13 A

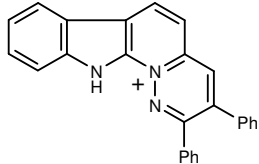
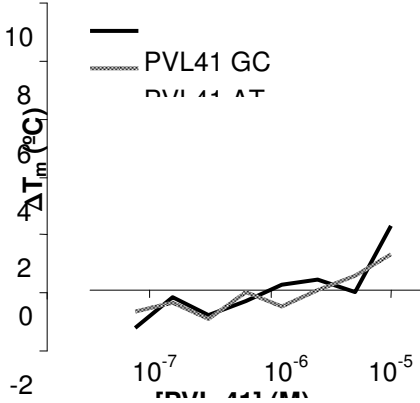
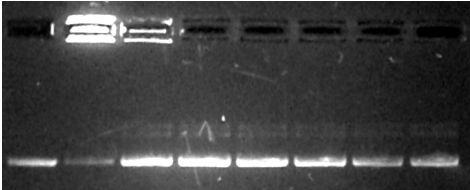
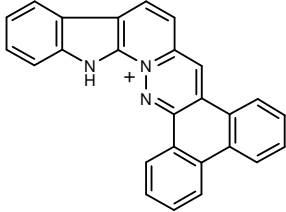
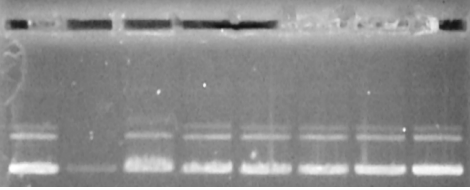
<i>α-Carbolinas</i>			
Compuesto y fórmula	Ensayo de fusión	Ensayo de intercalación	Resultados
<p>PVL-41</p> 			<p><i>No parece intercalar (No relaja plásmido S-). Destaca su alta fluorescencia unido a ADN. Unión muy débil ($\Delta T_m \approx 0^\circ\text{C}$)</i></p>
<p>PVL-18</p> 	<p><i>No se pudieron hacer los ensayos de fusión por la inestabilidad del compuesto en disolución.</i></p>		<p><i>Posible intercalante ya que parece relajar plásmido S-, aunque de forma no muy patente.</i></p>

Tabla 13 B

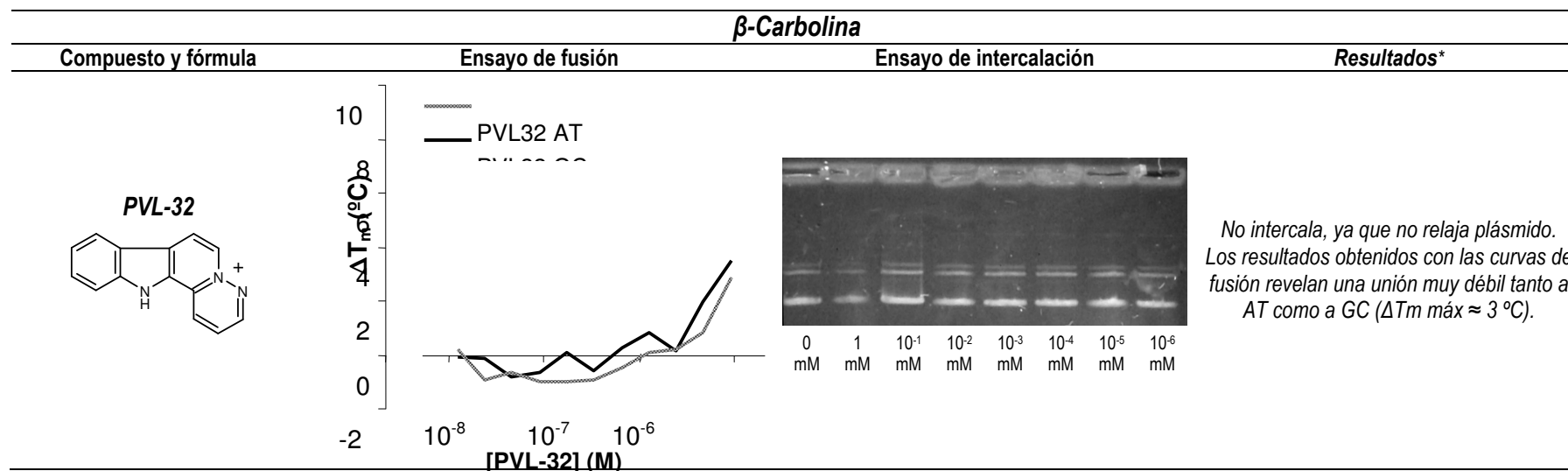
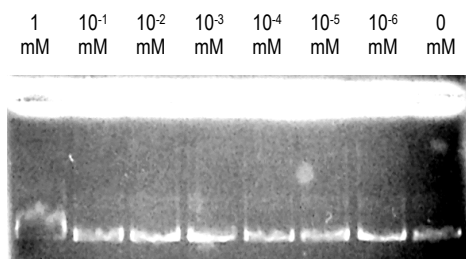
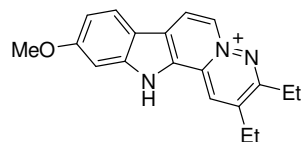
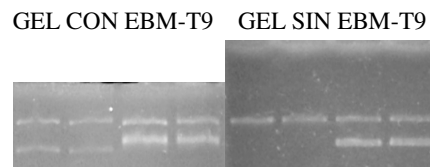


Tabla 14

EBM -T9



Ensayo de relajación de plásmido en gel

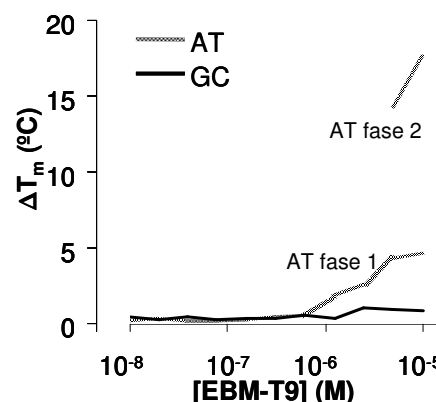
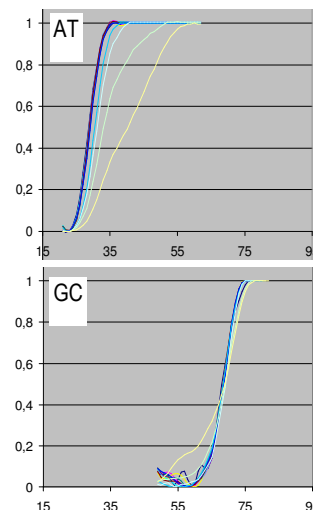


[EBM-T9] 0 0,1 0 0,1 0 0,1 0 0,1
mM mM mM mM mM mM mM mM
Plásmido R R S- S- R R S- S-

Análisis electroforético de plásmido superenrollado y relajado

S- = plásmido pBsk preferentemente superenrollado negativo
R = plásmido pBsk relajado por Topoisomerasa-I

Ensayo de fusión



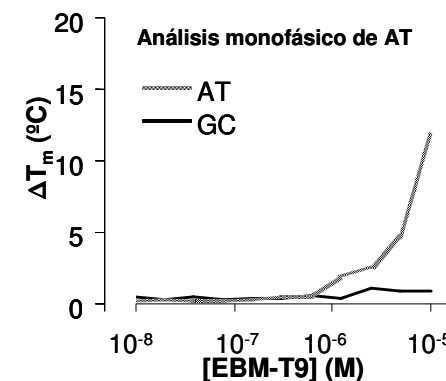
Incremento de temperatura de fusión con el aumento de concentración en las curvas de disociación obtenidas en TAE 2X. Se muestra el análisis bifásico del oligonucleótido AT.

Concentraciones de ligando: 0, $1.95 \cdot 10^{-8}$, $3.91 \cdot 10^{-8}$, $7.81 \cdot 10^{-8}$, $1.56 \cdot 10^{-7}$, $3.13 \cdot 10^{-7}$, $6.25 \cdot 10^{-7}$, $1.25 \cdot 10^{-6}$, $2.5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-5}$ y $2 \cdot 10^{-5}$ M (de izquierda a derecha).

Interpretación de resultados

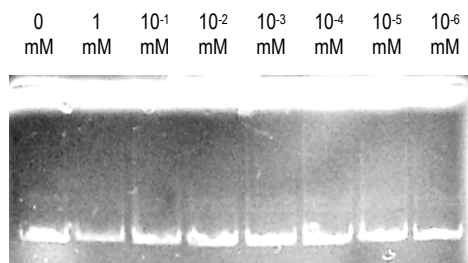
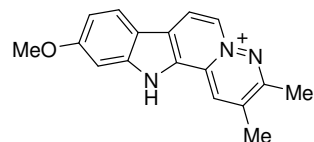
Es intercalante ya que, además de relajar plásmido, es capaz de superenrollar plásmido relajado.

Las curvas de fusión muestran una escasa unión al oligonucleótido GC ($\Delta T_m \text{ máx} \approx 2^\circ\text{C}$) mientras que las curvas de AT son bifásicas y con notable estabilización a altas concentraciones del ligando ($\Delta T_m \text{ máx} \approx 18^\circ\text{C}$).



Incremento de temperatura de fusión con el aumento de concentración en las curvas de disociación obtenidas en TAE 2X. Se muestra el análisis monofásico del oligonucleótido AT.

EBM –T78d

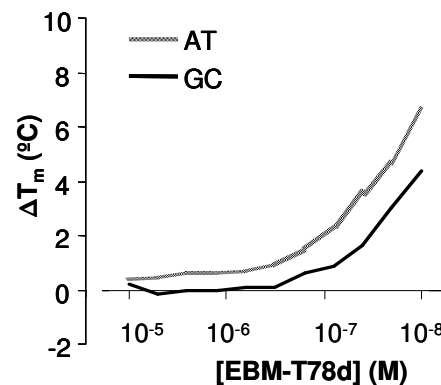
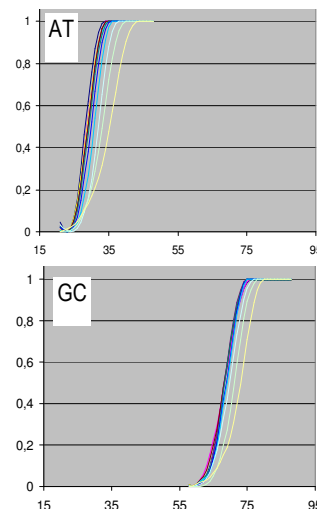


Ensayo de relajación de plásmido en gel

Análisis electroforético de plásmido superenrollado y relajado

S- = plásmido pBsk preferentemente superenrollado negativo
R = plásmido pBsk relajado por Topoisomerasa-I

Ensayo de fusión



Incremento de temperatura de fusión (*melting*) con el aumento de concentración en las curvas de disociación obtenidas en TAE 2X.

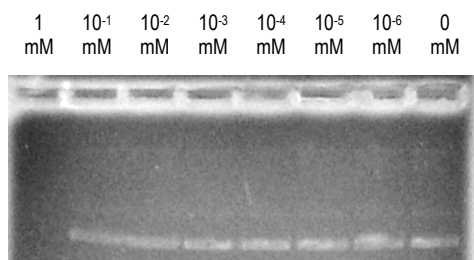
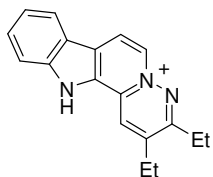
Concentraciones de ligando: 0 , $1,95 \cdot 10^{-8}$, $3,91 \cdot 10^{-8}$, $7,81 \cdot 10^{-8}$, $1,56 \cdot 10^{-7}$, $3,13 \cdot 10^{-7}$, $6,25 \cdot 10^{-6}$, $1,25 \cdot 10^{-4}$, $2,5 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-5}$ y $2 \cdot 10^{-5}$ M (de izquierda a derecha).

Interpretación de resultados

Aunque no relaja plásmido S-, es intercalante ya que superenrolla plásmido relajado.

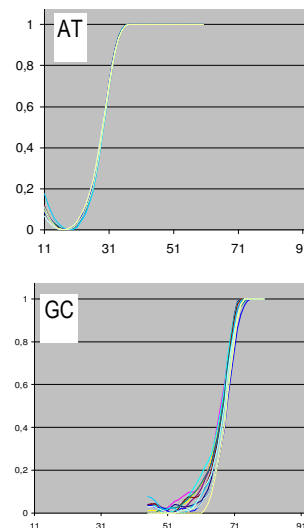
Unión preferente a AT, aunque se une a GC, según se observa en las curvas de fusión.

EBM-218



Ensayo de relajación de plásmido en gel

Ensayo de fusión



Concentraciones de ligando: 0 , $1.95 \cdot 10^{-8}$, $3.91 \cdot 10^{-8}$, $7.81 \cdot 10^{-8}$, $1.56 \cdot 10^{-7}$, $3.13 \cdot 10^{-7}$, $6.25 \cdot 10^{-7}$, $1.25 \cdot 10^{-6}$, $2.5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-5}$ y $2 \cdot 10^{-5}$ M (de izquierda a derecha).

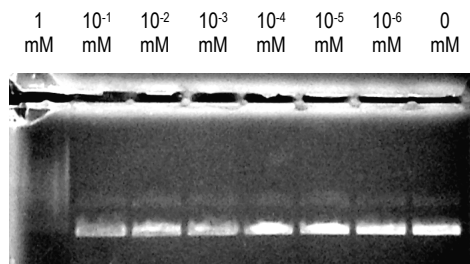
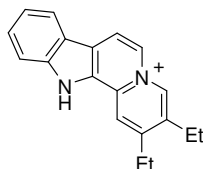
$$\Delta T_m \text{ AT/GC} = 0 \text{ } ^\circ\text{C}$$

Interpretación de resultados

El ensayo electroforético sugiere algún tipo de interacción a muy altas concentraciones. Se trata de un desplazamiento de banda no interpretable como intercalación.

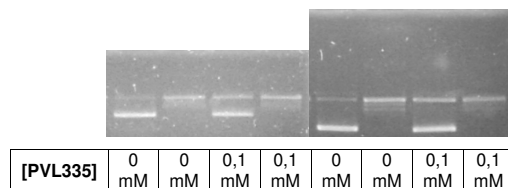
El ensayo de fusión no parece mostrar ninguna capacidad de unión a ADN, tanto con GC como con AT.

PVL-335



Ensayo de relajación de plásmido en gel

GEL CON PVL335 GEL SIN PVL335

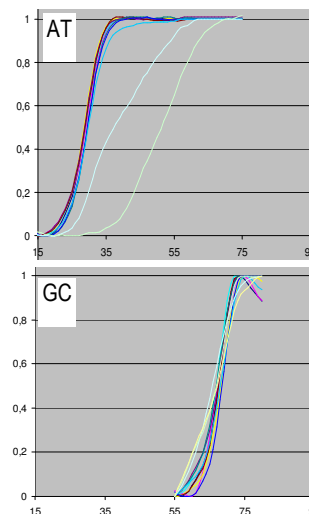


Plásmido S- R S- R S- R S- R

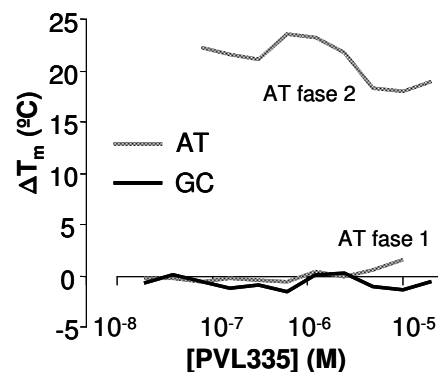
Análisis electroforético de plásmido superenrollado y relajado

S- = plásmido pBsk preferentemente superenrollado negativo
R = plásmido pBsk relajado por Topoisomerasa-I

Ensayo de fusión



Concentraciones de ligando: 0, $1.95 \cdot 10^{-8}$, $3.91 \cdot 10^{-8}$, $7.81 \cdot 10^{-8}$, $1.56 \cdot 10^{-7}$, $3.13 \cdot 10^{-7}$, $6.25 \cdot 10^{-6}$, $1.25 \cdot 10^{-4}$, $2.5 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-5}$ y $2 \cdot 10^{-5}$ M (de izquierda a derecha).



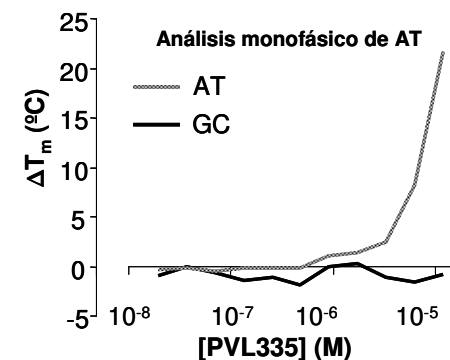
Incremento de temperatura de fusión con el aumento de concentración en las curvas de disociación obtenidas en TAE 2X. Se muestra el análisis bifásico de las curvas de AT.

Interpretación de resultados

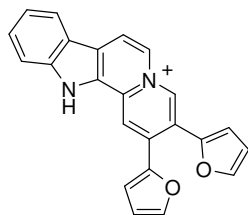
Derivado de β -carbolinio de estructura química similar a la anterior (EBM-218), con un nitrógeno menos.

No parece intercalante según los ensayos electroforéticos. No relaja plásmido superenrollado ni superenrolla plásmido relajado por topoisomerasa-I.

Las curvas de fusión revelan que este compuesto no se une a la secuencia rica en GCs y sin embargo, se une fuertemente a ATs (igual que EBM-T9). De hecho, las curvas AT son bifásicas y el aumento de T_m medio de la fase 2 (disociación del complejo ADN-ligando) es de 20°C aproximadamente.

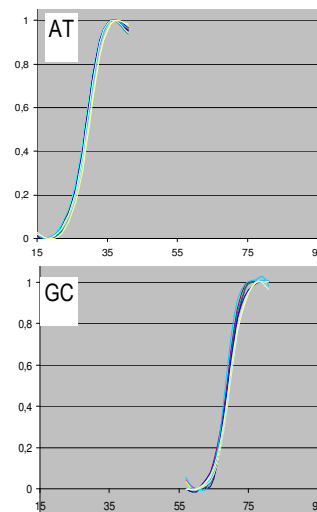


PVL-321



No se une a ADN

Ensayo de fusión



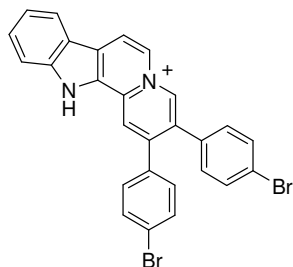
Concentraciones de ligando: 0 , $1.95 \cdot 10^{-8}$, $3.91 \cdot 10^{-8}$, $7.81 \cdot 10^{-8}$, $1.56 \cdot 10^{-7}$, $3.13 \cdot 10^{-7}$, $6.25 \cdot 10^{-6}$, $1.25 \cdot 10^{-4}$, $2.5 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-5}$ y $2 \cdot 10^{-5}$ M (de izquierda a derecha).

$$\Delta T_m \text{ AT/GC} = 0 \text{ } ^\circ\text{C}$$

Interpretación de resultados

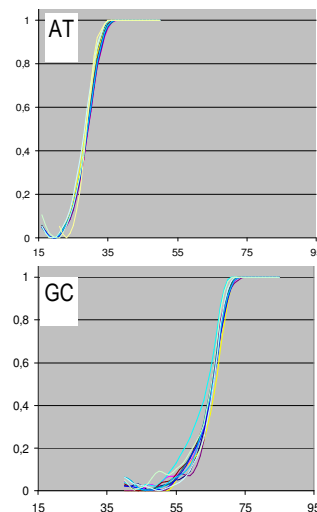
Se hizo en primer lugar el ensayo basado en el análisis de curvas de fusión y reveló que el compuesto no parece unirse a ADN ($\Delta T_m \text{ AT/GC} = 0$ °C), por lo que no se hicieron los estudios de intercalación.

PVL-306



No se une a ADN

Ensayo de fusión



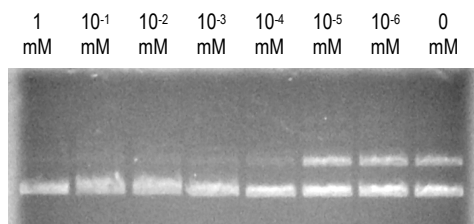
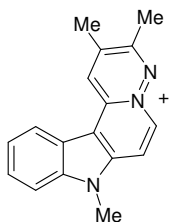
Concentraciones de ligando: 0 , $1,95 \cdot 10^{-8}$, $3,91 \cdot 10^{-8}$, $7,81 \cdot 10^{-8}$, $1,56 \cdot 10^{-7}$, $3,13 \cdot 10^{-7}$, $6,25 \cdot 10^{-6}$, $1,25 \cdot 10^{-4}$, $2,5 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-5}$ y $2 \cdot 10^{-5}$ M (de izquierda a derecha).

$$\Delta T_m \text{ AT/GC} = 0 \text{ } ^\circ\text{C}$$

Interpretación de resultados

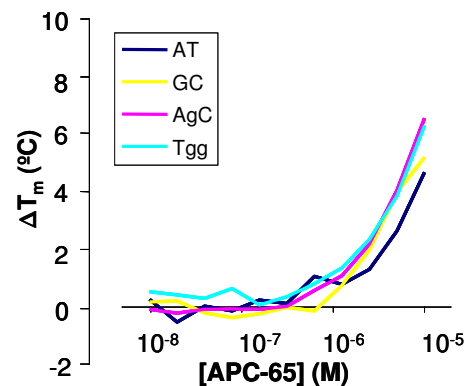
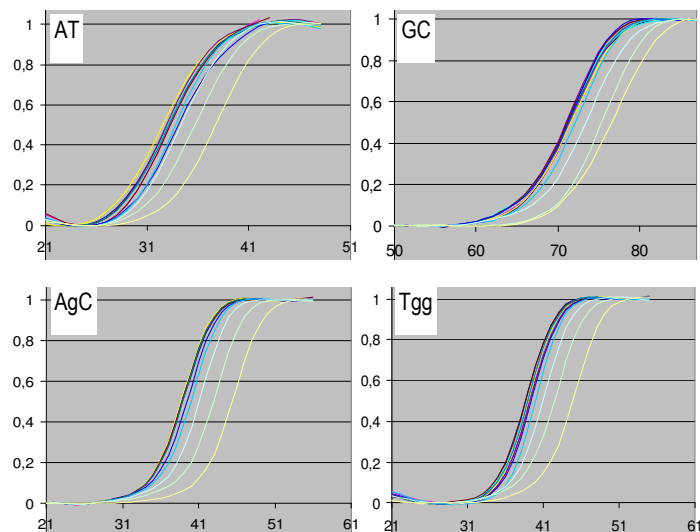
Se observa que las curvas de disociación coinciden en ausencia o presencia del compuesto ($\Delta T_m \text{ AT/GC} = 0 \text{ } ^\circ\text{C}$), luego no parece unirse a ADN, por lo que no se hicieron los estudios de intercalación.

APC-65



Ensayo de relajación de plásmido en gel

Ensayo de fusión



Incremento de temperatura de fusión (*melting*) con el aumento de concentración en las curvas de disociación obtenidas en TAE 2X.

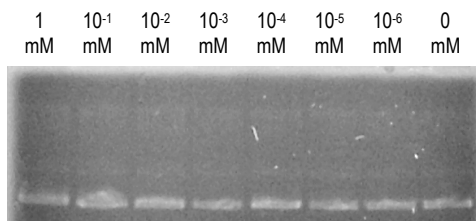
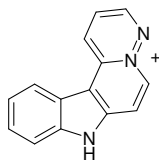
Concentraciones de ligando: 0, $1,95 \cdot 10^{-8}$, $3,91 \cdot 10^{-8}$, $7,81 \cdot 10^{-8}$, $1,56 \cdot 10^{-7}$, $3,13 \cdot 10^{-7}$, $6,25 \cdot 10^{-7}$, $1,25 \cdot 10^{-6}$, $2,5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-5}$ y $2 \cdot 10^{-5}$ M (de izquierda a derecha).

Interpretación de resultados

Es intercalante.

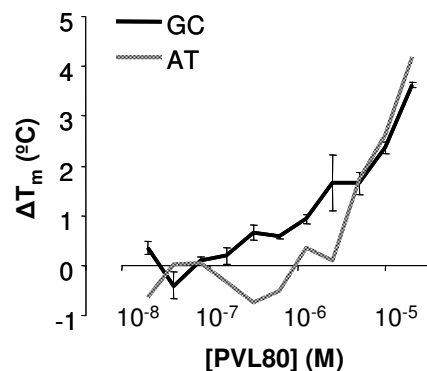
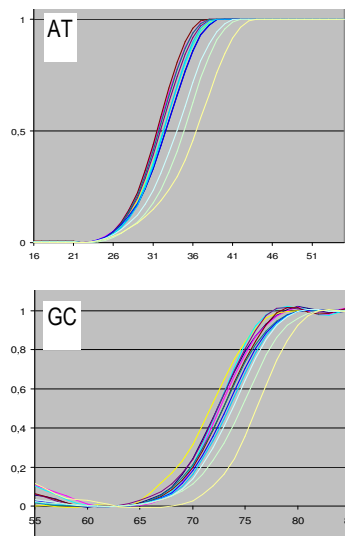
Según las curvas de disociación, presenta una unión al ADN de carácter débil ($\Delta T_m \text{ máx} = 6 \text{ } ^\circ\text{C}$) y parece comportarse igual independientemente de la secuencia, es decir, no tiene una clara preferencia de secuencia de unión, aunque quizá sea muy ligeramente menor por AT.

PVL80



Ensayo de relajación de plásmido en gel

Ensayo de fusión



Incremento de temperatura de fusión (*melting*) con el aumento de concentración en las curvas de disociación obtenidas en TAE 2X.

Concentraciones de ligando: 0 , $1.95 \cdot 10^{-8}$, $3.91 \cdot 10^{-8}$, $7.81 \cdot 10^{-8}$, $1.56 \cdot 10^{-7}$, $3.13 \cdot 10^{-7}$, $6.25 \cdot 10^{-7}$, $1.25 \cdot 10^{-6}$, $2.5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-5}$ y $2 \cdot 10^{-5}$ M (de izquierda a derecha).

Interpretación de resultados

Intercalante, puesto que relaja plásmido, aunque muy débilmente.

Interacción débil con ADN ($\Delta T_m \text{ máx} = 5$ °C). Apenas presenta selectividad de secuencia; si acaso, una muy ligera preferencia por GC.

En general, los dos tipos de ensayo empleados (electroforesis en gel de agarosa y curvas de fusión), muestran una interacción aún más débil que la del monómero sustituido APC-65.

3.3. Cromóforos derivados de azolodiazina

La tercera serie se ha obtenido a partir del sistema de pirrolopirazina (figura 62). En este caso el cromóforo de referencia es el sistema tetracíclico C.

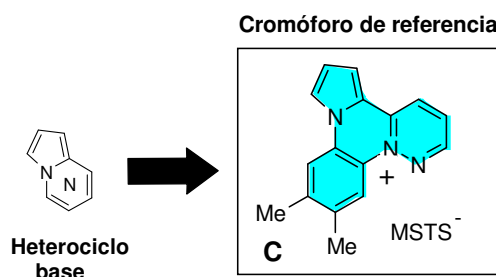


Figura 62. Heterociclo base y cromóforo de referencia de la serie de pirrolo[1,2-a]pirazinio.

Tabla 15. Compuestos que integran esta serie y su estructura (no se indica el contraión).

AGG-2-13	AGG-2-43	AGG-2-23	AGG-2-26
AGG-2-25	ABG-S01	AGG-2-24	AGG-2-36
AGG-2-22	AGG-2-34		

A la vista de la heterogeneidad de los resultados obtenidos con los pirrolopirazinios de esta serie resulta difícil establecer relaciones entre la estructura química y la interacción de estos cromóforos con el ADN. Los resultados muestran que el aumento de tamaño

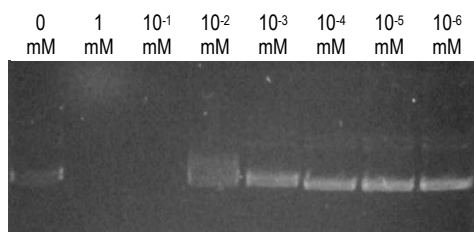
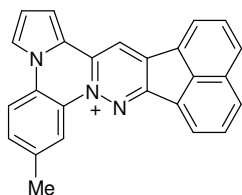
del cromóforo (pasando de cuatro a siete anillos, lo cual ocurre en los compuestos AGG-2.13 y AGG-2.43) parece estar relacionado con la capacidad de estos ligandos de unirse al ADN por intercalación, siendo esta unión de gran fortaleza, como se demuestra por el elevado incremento que producen en la temperatura de fusión de los oligonucleótidos AT y GC. En concreto, cabe destacar los resultados obtenidos con el compuesto AGG-2.13, con el que se alcanza un incremento en la temperatura de fusión próximo a 60 °C.

En general, el comportamiento de intercalación es bastante errático y débil en los sistemas tetracíclicos. Por este motivo, sólo se describen y discuten los resultados obtenidos con estos compuestos en forma de fichas individuales para cada cromóforo, que se presentan seguidamente. El compuesto AGG-2.26 se une en mayor medida que AGG-2.34, AGG-2.24 y ABG-S01.

En cualquier caso, los ejemplos estudiados no permiten determinar la influencia de los sustituyentes (tipo, número y posición) en el proceso de intercalación de estos ligandos con el ADN, aunque los grupos fenilos parecen favorecer la interacción con ADN.

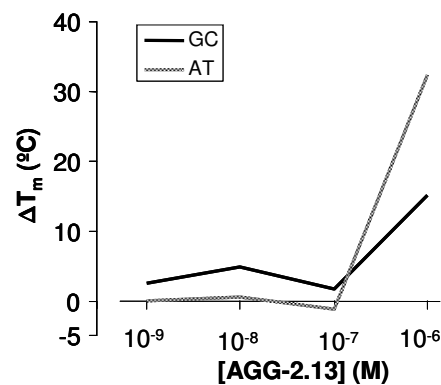
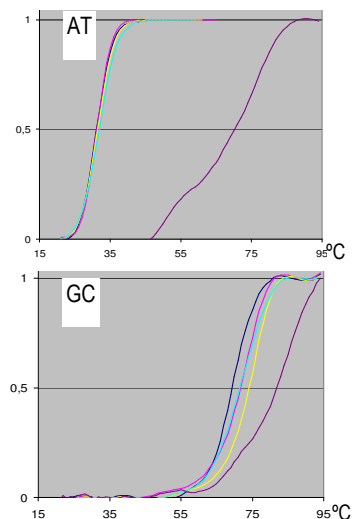
FICHAS CROMÓFOROS DERIVADOS DE AZOLODIAZINA

AGG-2-13



Ensayo de relajación de plásmido en gel

Ensayo de fusión



Incremento de temperatura de fusión con el aumento de concentración en las curvas de disociación obtenidas en TAE 2X.

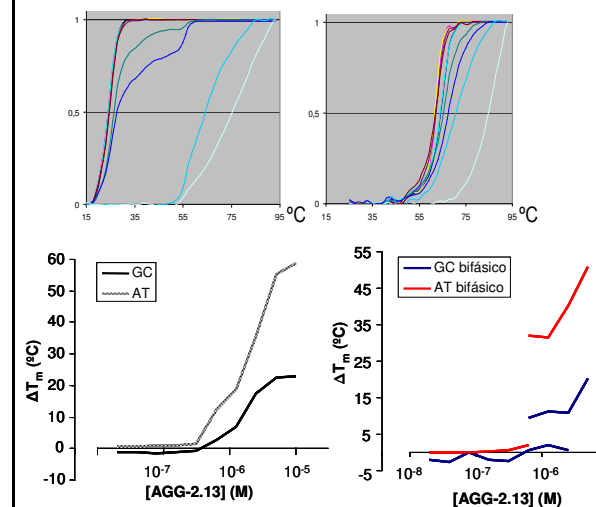
Concentraciones de ligando: 0, $1 \cdot 10^{-9}$, $1 \cdot 10^{-8}$, $1 \cdot 10^{-7}$ y $1 \cdot 10^{-6}$ M (de izquierda a derecha).

Interpretación de resultados

Intercalante.

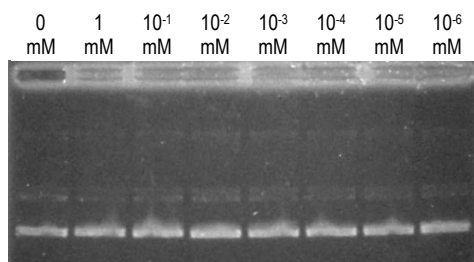
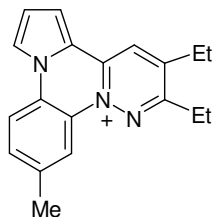
Gran unión al ADN (elevado ΔT_m). Se une con mayor preferencia a AT, ya que se produce una mayor estabilización (ΔT_m) a menor concentración que la necesaria para el oligonucleótido GC.

A altas concentraciones de ligando no hay curvas de AT en TAE (la fusión se da a temperaturas más altas y no se completa la curva), por lo que se realizan en fosfato potásico 20 mM:



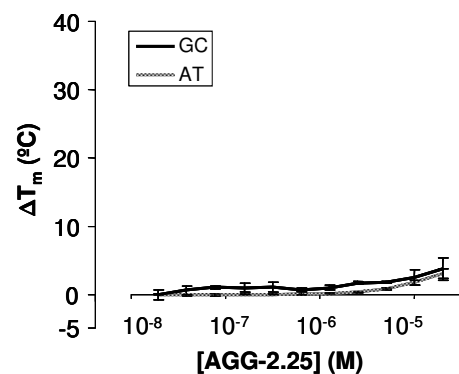
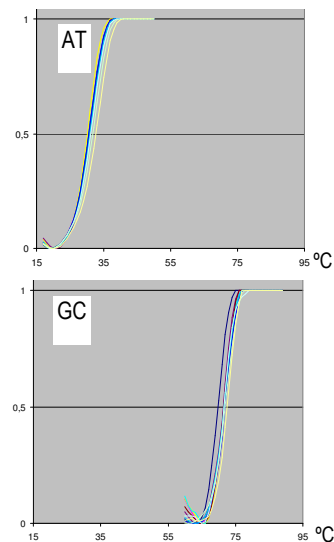
Curvas de disociación e incremento de temperatura de fusión en las mismas, obtenidas en fosfato. Concentraciones de ligando, de izquierda a derecha: 0, $1.95 \cdot 10^{-8}$, $3.91 \cdot 10^{-8}$, $7.81 \cdot 10^{-8}$, $1.56 \cdot 10^{-7}$, $3.13 \cdot 10^{-7}$, $6.25 \cdot 10^{-6}$, $1.25 \cdot 10^{-4}$, $2.5 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$ y $1 \cdot 10^{-5}$ M.

AGG-2-25



Ensayo de relajación de plásmido en gel

Ensayo de fusión



Incremento de temperatura de fusión (*melting*) con el aumento de concentración en las curvas de disociación obtenidas en TAE 2X.

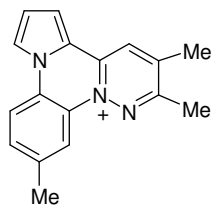
Concentraciones de ligando: 0, $1.95 \cdot 10^{-8}$, $3.91 \cdot 10^{-8}$, $7.81 \cdot 10^{-8}$, $1.56 \cdot 10^{-7}$, $3.13 \cdot 10^{-7}$, $6.25 \cdot 10^{-7}$, $1.25 \cdot 10^{-6}$, $2.5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-5}$ y $2 \cdot 10^{-5}$ M (de izquierda a derecha).

Interpretación de resultados

No parece intercalar.

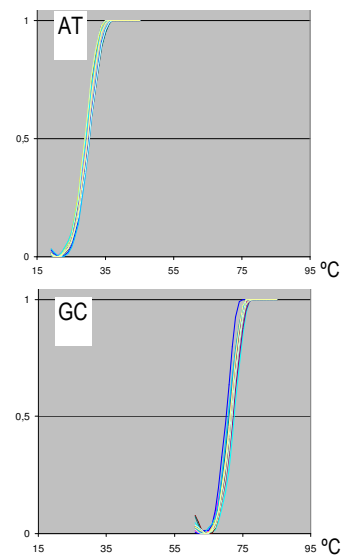
Unión muy débil al ADN, puesto que sólo se observa un ligero efecto en la disociación del ADN y a elevadas concentraciones del compuesto ($\Delta T_m^{\text{máx}} \approx 4$ °C), tanto con AT como con GC.

AGG-2-23



No se une a ADN.

Ensayo de fusión

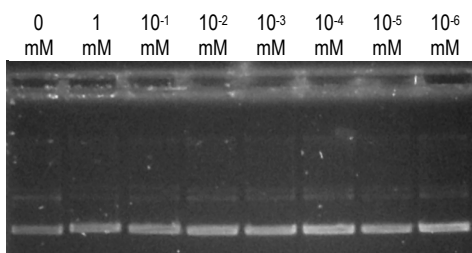
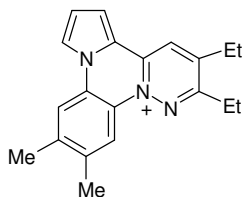


Concentraciones de ligando: 0 , $1.95 \cdot 10^{-8}$, $3.91 \cdot 10^{-8}$, $7.81 \cdot 10^{-8}$, $1.56 \cdot 10^{-7}$, $3.13 \cdot 10^{-7}$, $6.25 \cdot 10^{-6}$, $1.25 \cdot 10^{-4}$, $2.5 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-5}$ y $2 \cdot 10^{-5}$ M (de izquierda a derecha).

Interpretación de resultados

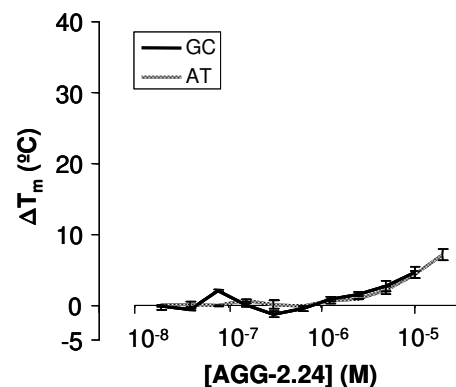
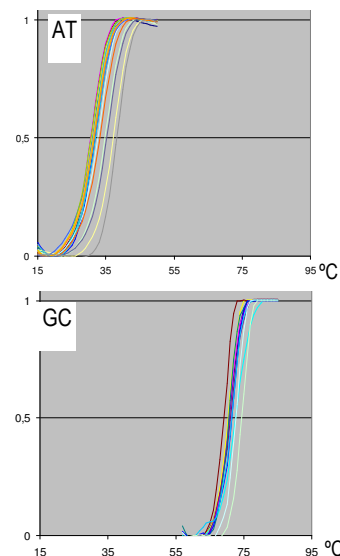
No parece unirse a ADN ($\Delta T_m \approx 0^\circ\text{C}$).

AGG-2-24



Ensayo de relajación de plásmido en gel

Ensayo de fusión



Incremento de temperatura de fusión (*melting*) con el aumento de concentración en las curvas de disociación obtenidas en TAE 2X.

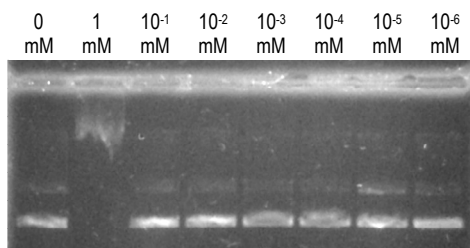
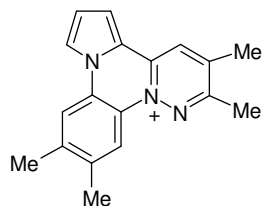
Concentraciones ligando: 0, $1.95 \cdot 10^{-8}$, $3.91 \cdot 10^{-8}$, $7.81 \cdot 10^{-8}$, $1.56 \cdot 10^{-7}$, $3.13 \cdot 10^{-7}$, $6.25 \cdot 10^{-8}$, $1.25 \cdot 10^{-4}$, $2.5 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-5}$ y $2 \cdot 10^{-5}$ M (de izquierda a derecha).

Interpretación de resultados

Intercalante (relaja plásmido aunque sólo ligeramente y a concentraciones altas).

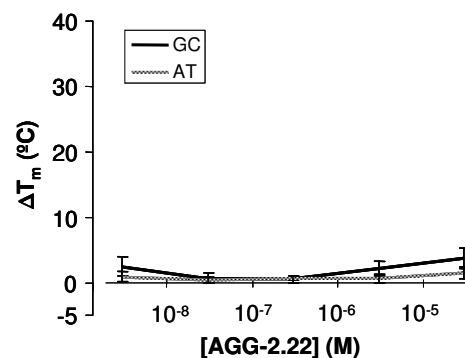
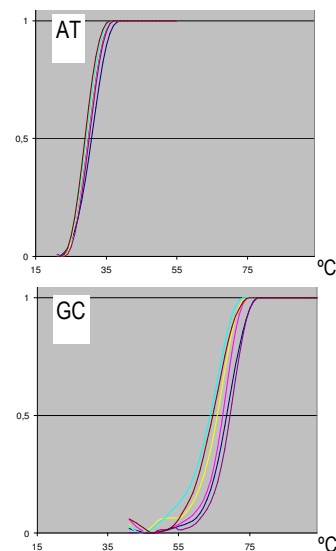
El análisis de las curvas de fusión revela que se une por igual a AT y GC, ya que el perfil de las curvas de ΔT_m frente a concentración de ligando es idéntico. Unión muy poco estabilizadora ($\Delta T_m \text{ máx} \approx 6^\circ\text{C}$).

AGG-2-22



Ensayo de relajación de plásmido en gel

Ensayo de fusión



Incremento de temperatura de fusión (*melting*) con el aumento de concentración en las curvas de disociación obtenidas en TAE 2X.

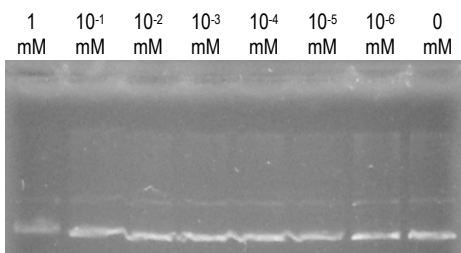
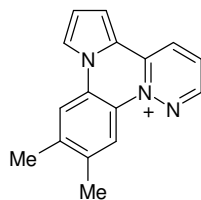
Concentraciones de ligando: 0 , $1.95 \cdot 10^{-8}$, $3.91 \cdot 10^{-8}$, $7.81 \cdot 10^{-8}$, $1.56 \cdot 10^{-7}$, $3.13 \cdot 10^{-7}$, $6.25 \cdot 10^{-7}$, $1.25 \cdot 10^{-6}$, $2.5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-5}$ y $2 \cdot 10^{-5}$ M (de izquierda a derecha).

Interpretación de resultados

No parece intercalarse. En el gel se observa un gran retraso en la migración de la banda a 1 mM del compuesto, pero es debida al arrastre que produce el ligando (con carga positiva) de ADN hacia el cátodo.

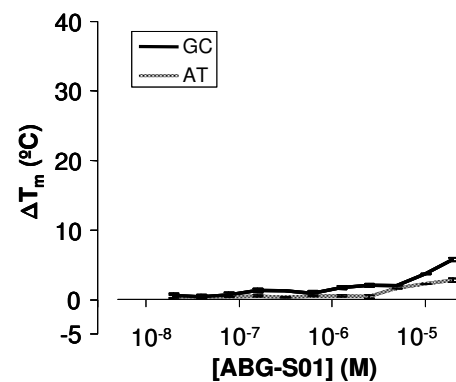
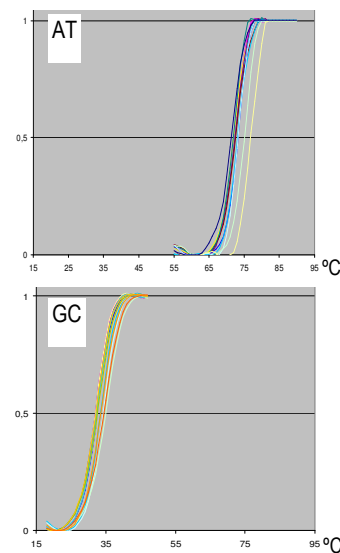
Prácticamente no se une a ADN, como se puede observar en las curvas de disociación (muy ligeramente a GC).

ABG-S01



Ensayo de relajación de plásmido en gel

Ensayo de fusión



Incremento de temperatura de fusión (*melting*) con el aumento de concentración en las curvas de disociación obtenidas en TAE 2X.

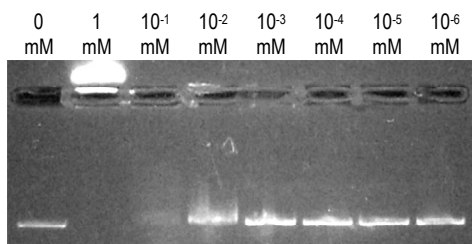
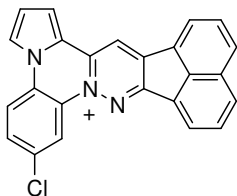
Concentraciones de ligando: 0 , $1.95 \cdot 10^{-8}$, $3.91 \cdot 10^{-8}$, $7.81 \cdot 10^{-8}$, $1.56 \cdot 10^{-7}$, $3.13 \cdot 10^{-7}$, $6.25 \cdot 10^{-7}$, $1.25 \cdot 10^{-6}$, $2.5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-5}$ y $2 \cdot 10^{-5}$ M (de izquierda a derecha).

Interpretación de resultados

Intercalante.

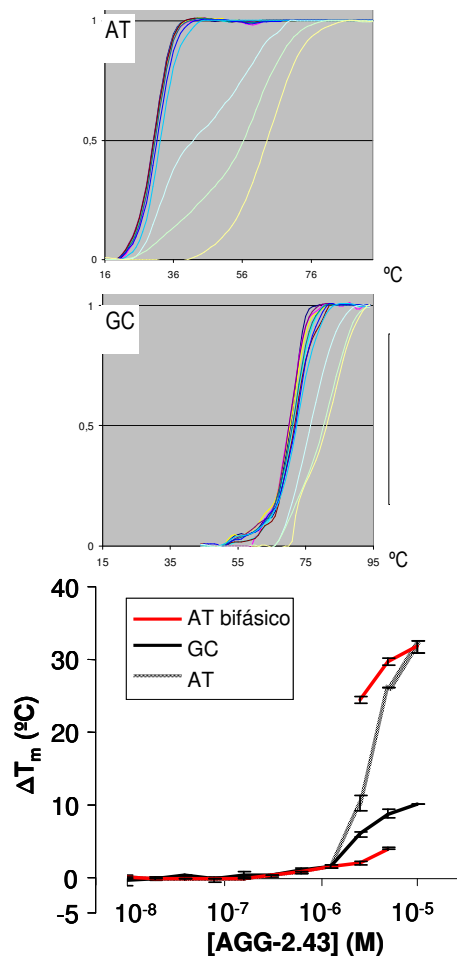
Unión débil a ADN, con preferencia por GC.

AGG-2-43



Ensayo de relajación de plásmido en gel

Ensayo de fusión



Incremento de temperatura de fusión (*melting*) con el aumento de concentración en las curvas de disociación obtenidas en TAE 2X. Para el oligo AT se muestran tanto el análisis monofásico como el bifásico.

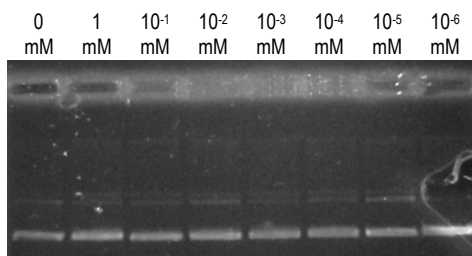
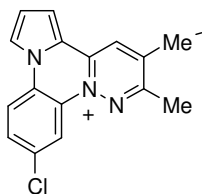
Concentraciones de ligando: 0 , $1.95 \cdot 10^{-8}$, $3.91 \cdot 10^{-8}$, $7.81 \cdot 10^{-8}$, $1.56 \cdot 10^{-7}$, $3.13 \cdot 10^{-7}$, $6.25 \cdot 10^{-7}$, $1.25 \cdot 10^{-6}$, $2.5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-5}$ y $2 \cdot 10^{-5}$ M (de izquierda a derecha).

Interpretación de resultados

Intercalante con unión preferente a AT.

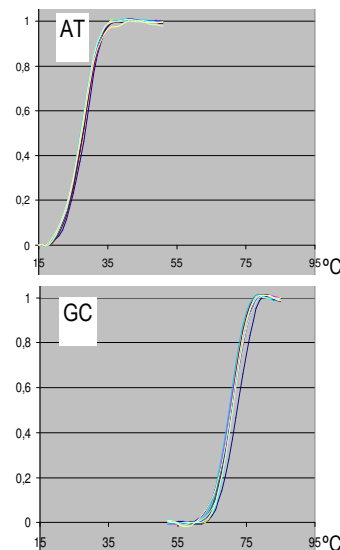
De hecho, con AT se observan curvas de disociación con dos fases, lo que indica que la reacción de unión tiene una cinética lenta. Por otra parte, el complejo formado es muy estable (ΔT_m AT máx ≈ 30 °C). Además, el aumento de ΔT_m de la primera fase refleja un modo de unión complejo, puesto que este aumento de T_m indica que esta fase no representa al ADN libre, sino a un complejo de unión poco estable.

AGG-2-36



Ensayo de relajación de plásmido en gel

Ensayo de fusión



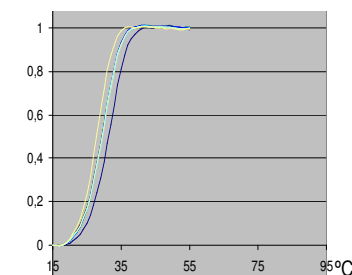
Concentraciones de ligando: 0 , $1.95 \cdot 10^{-8}$, $3.91 \cdot 10^{-8}$, $7.81 \cdot 10^{-8}$, $1.56 \cdot 10^{-7}$, $3.13 \cdot 10^{-7}$, $6.25 \cdot 10^{-7}$, $1.25 \cdot 10^{-6}$, $2.5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-5}$ y $2 \cdot 10^{-5}$ M (de izquierda a derecha).

Interpretación de resultados

No intercalante.

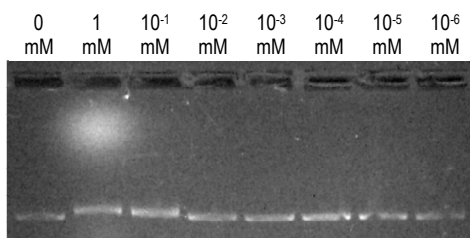
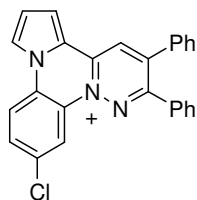
No parece unirse a ADN, puesto que su presencia no aumenta la temperatura de fusión ni del oligonucleótido AT ni del GC, en tampón TAE 2X.

En tampón fosfato potásico 20 mM, parece producir una ligera desestabilización de la doble cadena independientemente de la secuencia, es decir, se une débilmente a cadena sencilla.



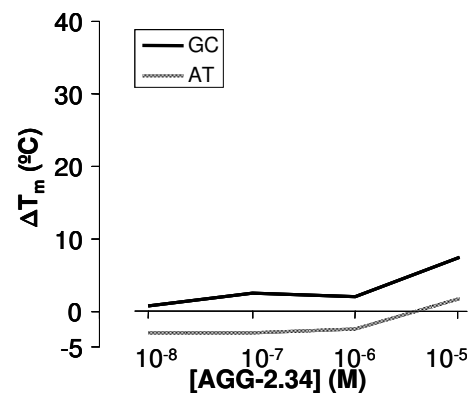
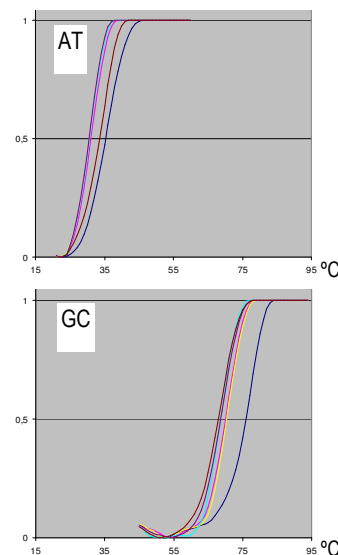
Curvas de disociación del oligonucleótido AT en fosfato potásico 20 mM.

AGG-2-34



Ensayo de relajación de plásmido en gel

Ensayo de fusión



Incremento de temperatura de fusión (*melting*) con el aumento de concentración en las curvas de disociación obtenidas en TAE 2X.

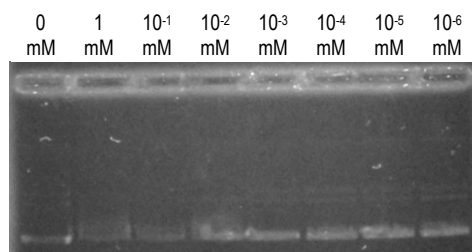
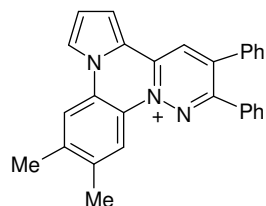
Concentraciones de ligando: 0, $1 \cdot 10^{-9}$, $1 \cdot 10^{-8}$, $1 \cdot 10^{-7}$ y $1 \cdot 10^{-6}$ M (de izquierda a derecha).

Interpretación de resultados

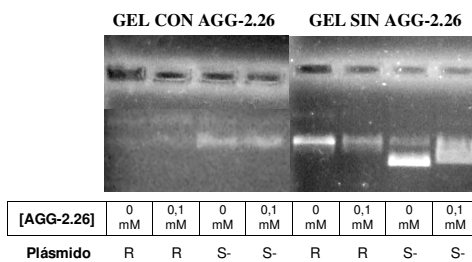
Intercalante.

Según las curvas de disociación, su unión al ADN es débil: sólo causa un aumento en la temperatura de fusión a altas concentraciones. Preferencia ligera por GC.

AGG-2-26



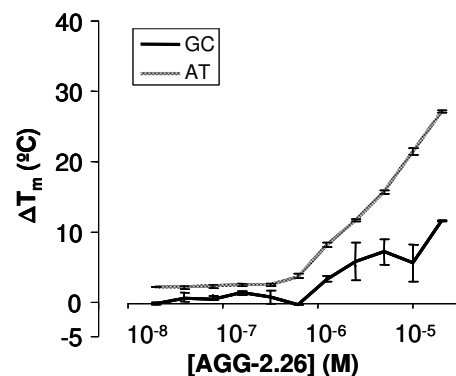
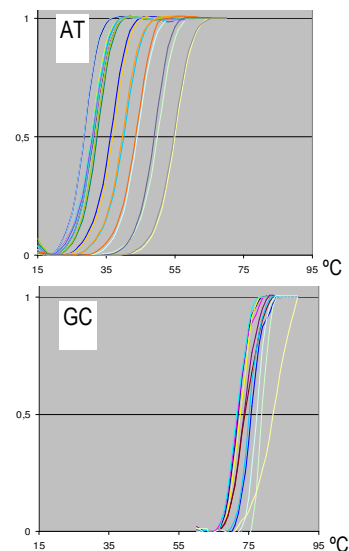
Ensayo de relajación de plásmido en gel



Análisis electroforético de plásmido superenrollado y relajado

S- = plásmido pBsk preferentemente superenrollado negativo
R = plásmido pBsk relajado por Topoisomerasa-I

Ensayo de fusión



Incremento de temperatura de fusión (*melting*) con el aumento de concentración en las curvas de disociación obtenidas en TAE 2X.

Concentraciones de ligando: 0, $1.95 \cdot 10^{-8}$, $3.91 \cdot 10^{-8}$, $7.81 \cdot 10^{-8}$, $1.56 \cdot 10^{-7}$, $3.13 \cdot 10^{-7}$, $6.25 \cdot 10^{-7}$, $1.25 \cdot 10^{-6}$, $2.5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-5}$ y $2 \cdot 10^{-5}$ M (de izquierda a derecha).

Interpretación de resultados

Intercalante con clara preferencia por AT, secuencia con la que se observa un mayor aumento de T_m y a menores concentraciones que con GC. ΔT_m AT máx ≈ 25 °C; ΔT_m GC máx ≈ 10 °C.

3.4. Bis-sales basadas en cromóforos de γ -carbolina

La unión por diferentes cadenas de uno de los cromóforos de γ -carbolinio anteriormente detallados generó diversas bis-sales con potencialidad bis-intercalante que se detallan en la figura 63.

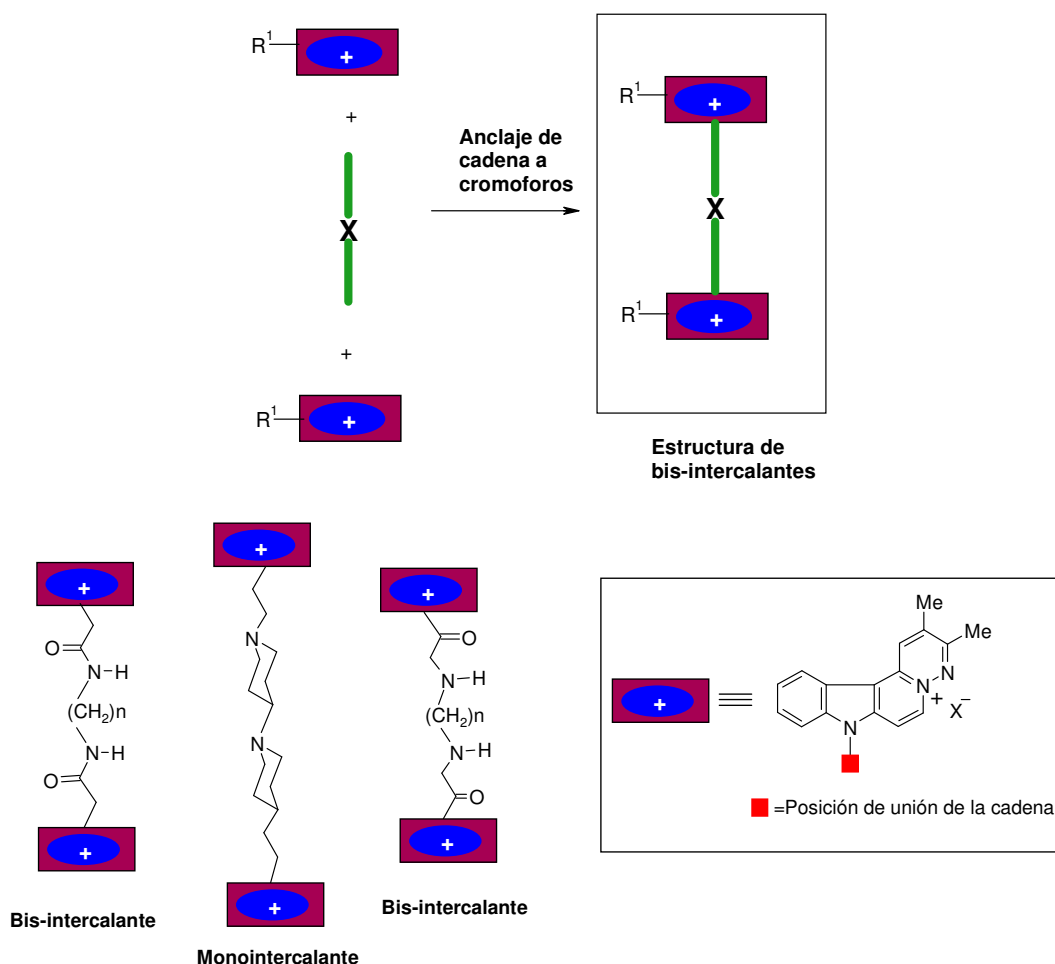


Figura 63. Estructura de bis-intercalantes generados a partir de un cromóforo de γ -carbolina.

Estudios iniciales revelaron que la cadena de unión de bis-piperidina (presente en el ditercalinio) no confiere al sistema propiedades de bis-intercalante pero que cadenas más flexibles como diamidas o polimetilenos hacen que las correspondientes bis-sales se comporten como bis-intercalante, aumentando la afinidad de estos sistemas varios órdenes de magnitud.

Tabla 16. Estructura y nombre de los compuestos que forman esta serie.

AMP-9.4	AMP-9.43	AMP-9.67
AMP-10.15	AMP-10.37	AMP-10.32

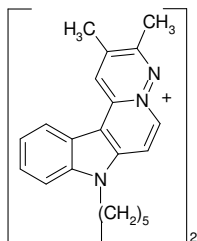
A diferencia de los resultados obtenidos con los cromóforos monointercalantes de γ -carbolinio PVL-80 y APC-65, las bis-sales muestran una elevada afinidad por el ADN, puesto que son capaces de aumentar la temperatura de fusión de éste a partir de concentraciones bajas. Además, los complejos ADN-ligando son altamente estables (ΔT_m máximo de 30 a 40 °C). Por lo tanto, la dimerización aumenta la interacción con ADN y los complejos formados son más estables, de forma más notable a partir de cierta longitud en la cadena de unión entre monómeros.

La naturaleza de la cadena de unión de los cromóforos monointercalantes influye en la interacción, modulándola. En concreto, el comportamiento de las bis-sales con cadenas polimetilénicas (AMP-9.4, 9.43 y 9.67) es muy similar entre todas ellas, independientemente de la longitud de la cadena y todas presentan gran afinidad en la unión al ADN, mayor que la observada en las bis-sales que incorporan cadenas amídicas (AMP-10.15 y 10.37). Por otra parte, la cadena presente en AMP-10.32, derivada de la piperidina, parece ser la causante de la baja solubilidad de este ligando.

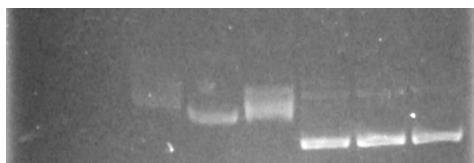
En las páginas siguientes se presentan los resultados obtenidos y su correspondiente discusión, de nuevo organizados a modo de fichas para cada compuesto.

FICHAS BIS-SALES BASADAS EN CROMOFOROS DE γ -CARBOLINA

AMP-9.4

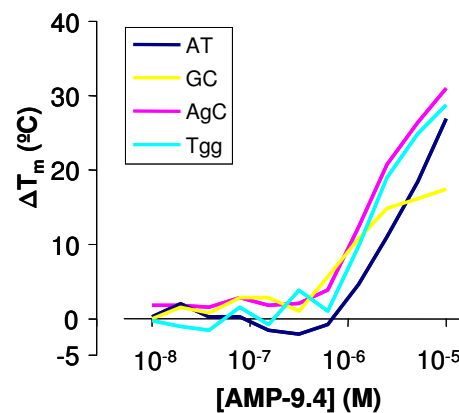
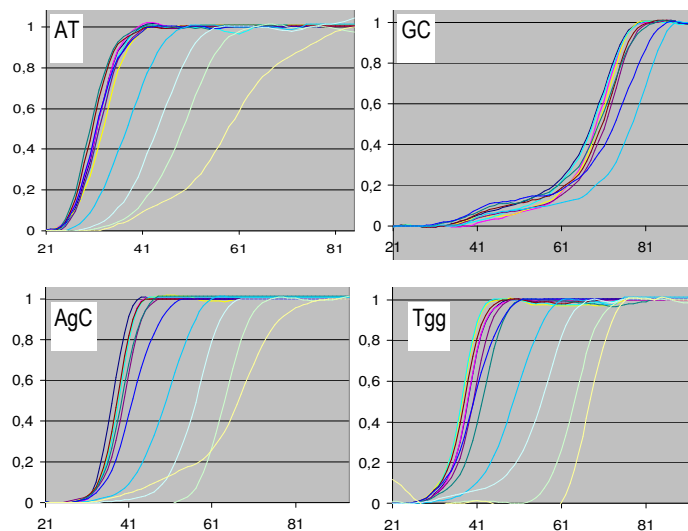


1 mM 10⁻¹ mM 10⁻² mM 10⁻³ mM 10⁻⁴ mM 10⁻⁵ mM 10⁻⁶ mM 0 mM



Ensayo de relajación de plásmido en gel

Ensayo de fusión



Incremento de temperatura de fusión (*melting*) con el aumento de concentración en las curvas de disociación obtenidas en TAE 2X.

Concentraciones de ligando: 0, 1,95·10⁻⁸, 3,91·10⁻⁸, 7,81·10⁻⁸, 1,56·10⁻⁷, 3,13·10⁻⁷, 6,25·10⁻⁶, 1,25·10⁻⁴, 2,5·10⁻⁴, 5·10⁻⁴, 1·10⁻⁵ y 2·10⁻⁵ M (de izquierda a derecha).

Interpretación de resultados

Intercalante: relaja ADN plasmídico, incluso a concentraciones bajas (desde 0,1 μM).

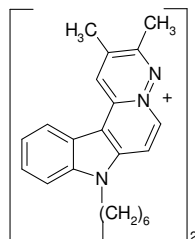
Por otra parte, según las curvas de disociación, la estabilidad de los complejos formados por este dímero es alta (ΔT_m máx entre 20 y 30 °C). Se hicieron los experimentos en TAE y en fosfato.

En TAE 2X, la menor preferencia es hacia AT, ya que parece ser necesaria una mayor concentración del ligando para obtener el mismo efecto (ΔT_m) que se consigue con otras secuencias.

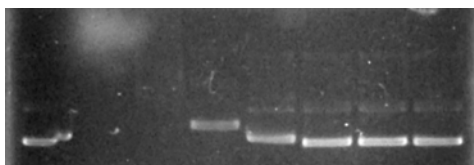
En fosfato se obtienen curvas bifásicas (porque la cinética es lenta). El orden de preferencia en la unión es GC ≥ AT > Tgg > AgC, según el parámetro C₅₀ o concentración a la que la proporción de las dos fases (ADN libre y complejo) es la misma:

	AgC	Tgg	AT	GC
C ₅₀ (μM)	1,75	0,99	0,86	0,80

AMP-9.43

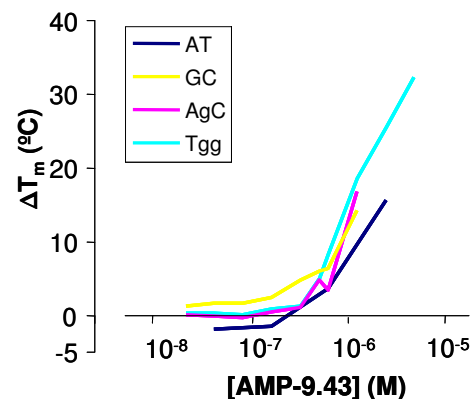
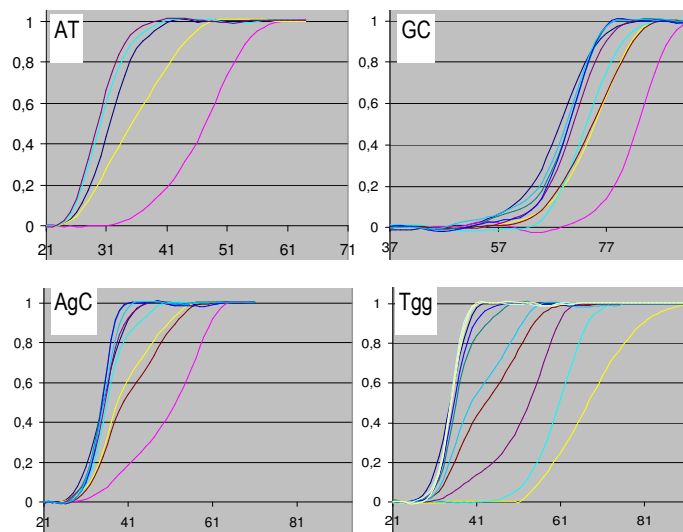


0 mM 1 mM 10^{-1} mM 10^{-2} mM 10^{-3} mM 10^{-4} mM 10^{-5} mM 10^{-6} mM



Ensayo de relajación de plásmido en gel

Ensayo de fusión



Incremento de temperatura de fusión (*melting*) con el aumento de concentración en las curvas de disociación obtenidas en TAE 2X.

Concentraciones de ligando: 0, $1.95 \cdot 10^{-8}$, $3.91 \cdot 10^{-8}$, $7.81 \cdot 10^{-8}$, $1.56 \cdot 10^{-7}$, $3.13 \cdot 10^{-7}$, $6.25 \cdot 10^{-6}$, $1.25 \cdot 10^{-4}$, $2.5 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-5}$ y $2 \cdot 10^{-5}$ M (de izquierda a derecha).

Interpretación de resultados

Es intercalante.

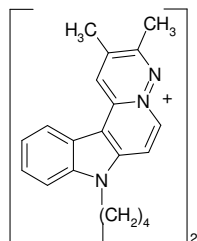
Con respecto a las curvas de disociación, no se dispone de datos a altas concentraciones del ligando ya que no es posible registrar las curvas, quizá debido a efectos de apantallamiento o *quenching* de la fluorescencia emitida por el oligonucleótido-FAM. Con los datos obtenidos, parece que empieza a observarse el efecto de la unión del ligando (ΔT_m) a concentraciones menores con el oligonucleótido GC, lo que indicaría preferencia hacia esta secuencia.

Los mismos experimentos de fusión pero en tampón fosfato generan curvas bifásicas. El parámetro C_{50} (concentración a la que hay un 50% de fase 1 o ADN libre y de fase 2 o complejo) indica mayor preferencia frente a AgC que frente a Tgg y AT. Sin embargo, no se obtienen datos para GC ya que las curvas se desplazan hacia rangos de temperatura que no se pueden analizar.

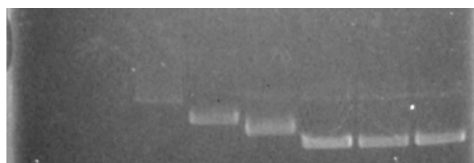
	AgC	Tgg	AT	GC
C_{50} (μ M)	0,72	0,54	0,56	*

* : no se registra la curva de fusión de la segunda fase completa (sólo complejo ADN-ligando).

AMP-9.67

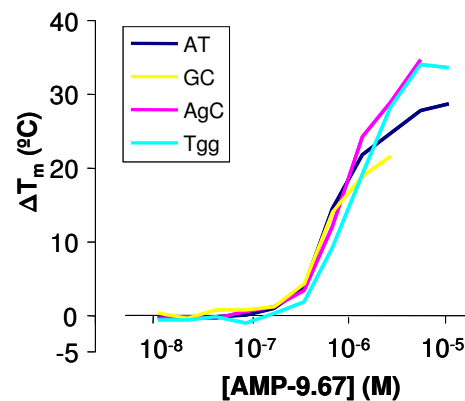
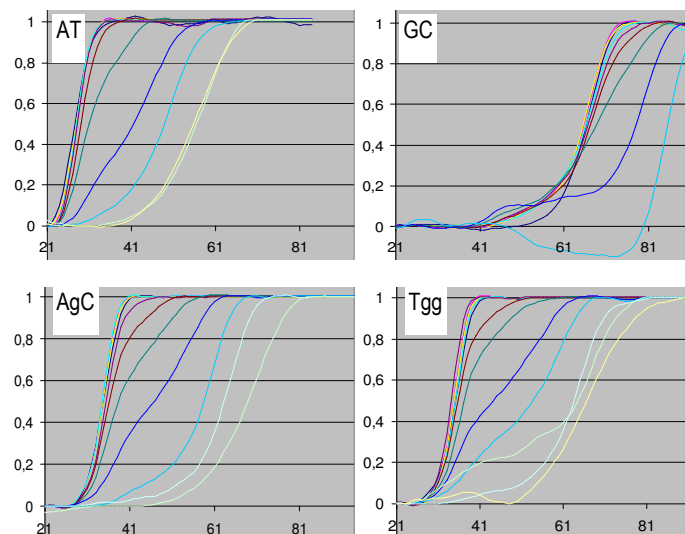


1 mM 10⁻¹ mM 10⁻² mM 10⁻³ mM 10⁻⁴ mM 10⁻⁵ mM 10⁻⁶ mM 0 mM



Ensayo de relajación de plásmido en gel

Ensayo de fusión



Incremento de temperatura de fusión (*melting*) con el aumento de concentración en las curvas de disociación obtenidas en TAE 2X.

Concentraciones de ligando: 0, 1.95·10⁻⁸, 3.91·10⁻⁸, 7.81·10⁻⁸, 1.56·10⁻⁷, 3.13·10⁻⁷, 6.25·10⁻⁶, 1.25·10⁻⁴, 2.5·10⁻⁴, 5·10⁻⁴, 1·10⁻⁵ y 2·10⁻⁵ M (de izquierda a derecha).

Interpretación de resultados

Intercalante.

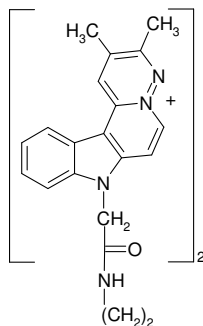
Se une tanto a secuencias ATs como GCs. En cuanto a la preferencia, no se observan diferencias salvo para el oligonucleótido Tgg, que parece el peor.

Según los datos de C₅₀ obtenidos en tampón fosfato, parece tener preferencia por AgC, incluso frente a ACC/Tgg.

	AgC	Tgg	AT	GC
C ₅₀ (μM)	0,64	0,52	0,44	*

* : no se registra la curva de fusión de la segunda fase completa (sólo complejo ADN-ligando) por las altas temperaturas a las que se produce.

AMP-10.15

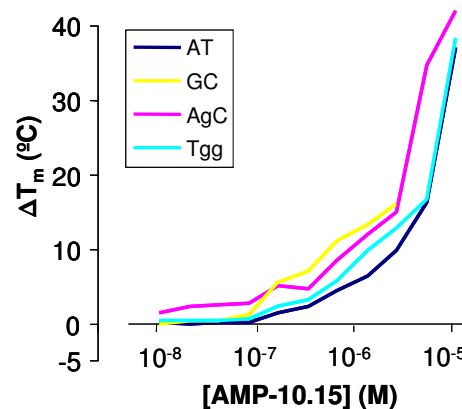
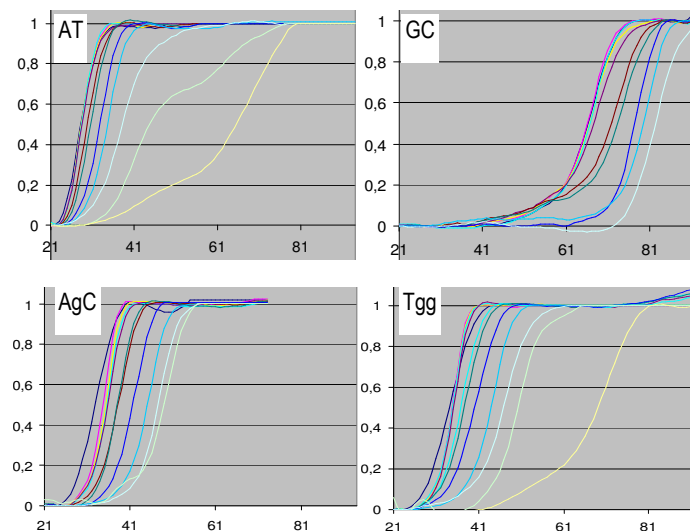


0 mM 1 mM 10⁻¹ mM 10⁻² mM 10⁻³ mM 10⁻⁴ mM 10⁻⁵ mM 10⁻⁶ mM



Ensayo de relajación de plásmido en gel

Ensayo de fusión



Incremento de temperatura de fusión (*melting*) con el aumento de concentración en las curvas de disociación obtenidas en TAE 2X.

Concentraciones de ligando: 0, $1.95 \cdot 10^{-8}$, $3.91 \cdot 10^{-8}$, $7.81 \cdot 10^{-8}$, $1.56 \cdot 10^{-7}$, $3.13 \cdot 10^{-7}$, $6.25 \cdot 10^{-7}$, $1.25 \cdot 10^{-6}$, $2.5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-5}$ y $2 \cdot 10^{-5}$ M (de izquierda a derecha).

Interpretación de resultados

Intercalante.

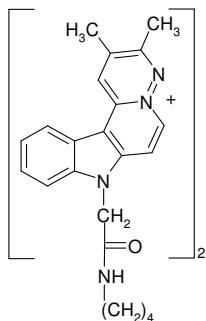
Presenta una unión muy estabilizadora (ΔT_m máx de alrededor de 40 °C) con preferencia por GC.

En tampón fosfato las curvas de fusión son bifásicas y según el parámetro C_{50} o concentración a la que la proporción de las dos fases es la misma, el orden de preferencia es: Tgg=AT>AgC:

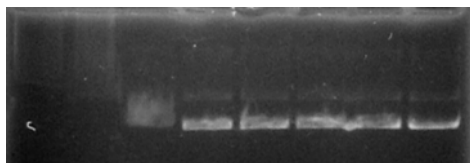
	AgC	Tgg	AT	GC
C_{50} (μM)	4,45	6,99	6,97	*

* : no se registra la curva de fusión de la segunda fase completa (sólo complejo ADN-ligando) por las altas temperaturas a las que se produce.

AMP-10.37

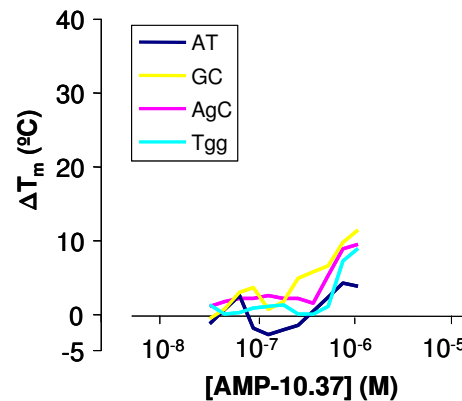
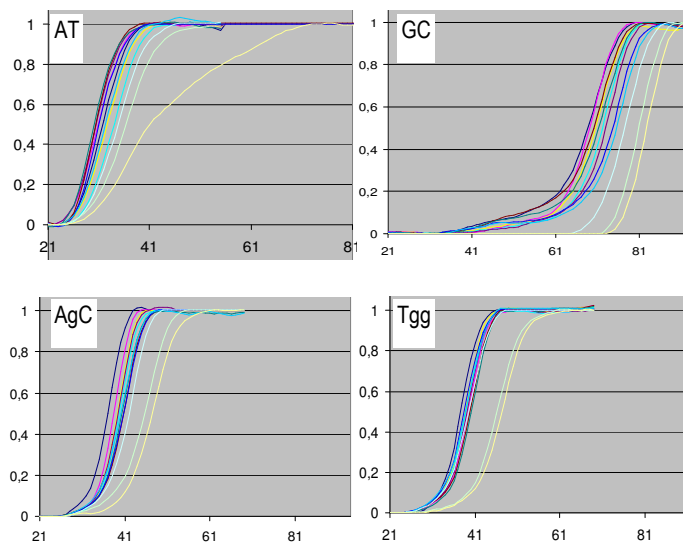


1 mM 10⁻¹ mM 10⁻² mM 10⁻³ mM 10⁻⁴ mM 10⁻⁵ mM 10⁻⁶ mM 0 mM



Ensayo de relajación de plásmido en gel

Ensayo de fusión



Incremento de temperatura de fusión (*melting*) con el aumento de concentración en las curvas de disociación obtenidas en TAE 2X.

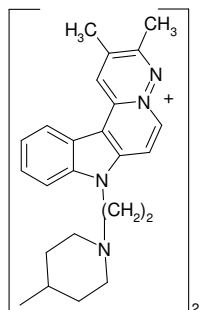
Concentraciones de ligando: 0, $1.95 \cdot 10^{-8}$, $3.91 \cdot 10^{-8}$, $7.81 \cdot 10^{-8}$, $1.56 \cdot 10^{-7}$, $3.13 \cdot 10^{-7}$, $6.25 \cdot 10^{-7}$, $1.25 \cdot 10^{-6}$, $2.5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-5}$ y $2 \cdot 10^{-5}$ M (de izquierda a derecha).

Interpretación de resultados

Es intercalante.

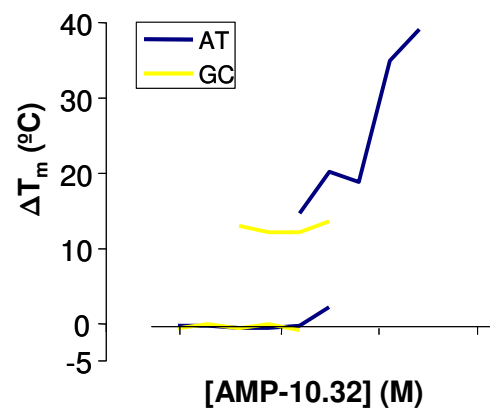
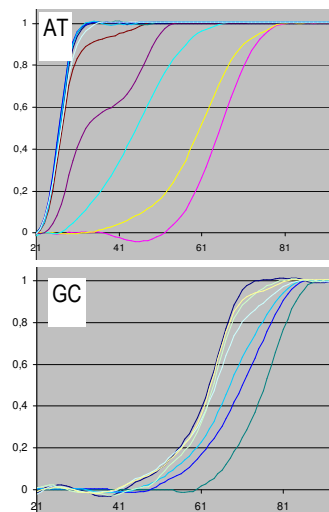
Este es el único de los dímeros de esta serie que da curvas monofásicas en los dos tampones. En ambos casos ocurre como se muestra para TAE: la unión es preferente por GC y con en efecto muy poco notable (ΔT_m relativamente bajos).

AMP-10.32



Ensayo de relajación de plásmido en gel:
Capacidad intercalante probada [288].

Ensayo de fusión



Incremento de temperatura de fusión con el aumento de concentración en las curvas de disociación obtenidas en TAE 2X. No se indican concentraciones porque se desconocen, ya que el compuesto no se disuelve por completo.

Las concentraciones del ligando son desconocidas ya que el compuesto no se disolvió bien. Son crecientes de izquierda a derecha.

Interpretación de resultados

Es intercalante.

Las curvas de disociación obtenidas en TAE 2X son bifásicas, lo que indica que la reacción de unión es lenta. La concentración de compuesto a la que se da un 50% de las dos fases (ADN libre y complejo ADN-ligando) o C_{50} indica que se une preferentemente a GC ya que $C_{50 \text{ AT}}$ es mayor que $C_{50 \text{ GC}}$. Sin embargo, el complejo que se forma con el oligonucleótido AT es más estable (mayor ΔT_m para una misma concentración).

CONCLUSIONES

Las aportaciones de este trabajo se pueden resumir en las siguientes conclusiones:

1. Se ha desarrollado un método miniaturizado y de elevado rendimiento para el estudio de la secuencia preferente de unión de ligandos de diversa naturaleza al ADN, basándose en el análisis de curvas de fusión de oligonucleótidos marcados con fluorescencia y con el empleo de un termociclador para la lectura de los datos.
2. Ha sido posible aplicar este método a un elevado número de compuestos ya que es sensible, eficaz y requiere un mínimo consumo de tiempo y reactivos.
3. Dicho método ha sido optimizado y validado con distintos compuestos de bajo peso molecular cuya interacción con ADN había sido ya establecida a través de otras metodologías. Así, se ha estudiado la interacción de compuestos con distintos modos de interacción con el ADN: ligandos con unión al surco menor (DAPI y Hoescht 33258), los agentes monointercalantes bromuro de etidio y doxorubicina (que, además, interacciona de forma no intercalante mediante su aminoazúcar), varios bisintercalantes (TOTO-I, tiocoralina-A y equinomicina), ligandos con unión covalente (diversas ecteinascidinas y derivados) y compuestos con unión compleja al ADN (como la bis-sal AMP-10.15, derivada de 1-metil- γ -carbolina y S23906-1, que se une preferentemente al ADN de cadena sencilla).
4. Se ha aplicado este método a la caracterización de la unión a ADN de una quimioteca de compuestos catiónicos heteroaromáticos sintetizados en el grupo de investigación, determinando su preferencia general de secuencia y evaluando, por otra parte, su capacidad de unión al ADN por intercalación mediante ensayos electroforéticos. Así, se ha analizado la interacción con ADN de cromóforos derivados de bencimidazol y benzotiazol, ligandos derivados de carbolina, derivados de azolodiazina y bis-sales basadas en cromóforos de γ -carbolina.
5. Se han podido establecer algunas relaciones estructura-actividad con los resultados obtenidos mediante el empleo de esta metodología en el estudio de la interacción de estas series de compuestos con ADN.

REFERENCIAS

1. Vashisht Gomal, Y.N. and M.W. Van Dyke, *Combinatorial determination of sequence specificity for nanomolar DNA-binding hairpin polyamides*. Biochemistry, 2003. **42**(22): p. 6891-903.
2. Trauger, J.W., E.E. Baird, and P.B. Dervan, *Recognition of DNA by designed ligands at subnanomolar concentrations*. Nature, 1996. **382**(6591): p. 559-61.
3. Geierstanger, B.H. and D.E. Wemmer, *Complexes of the minor groove of DNA*. Annu Rev Biophys Biomol Struct., 1995. **24**: p. 463-93.
4. Thomas, R., C. González, C. Roberts, J. Botyanszki, L. Lou, and E.F. Michelotti, *A novel assay to determine the sequence preference and affinity of DNA minor groove binding compounds*. Nucleic Acids Research 2004. **32**(1): p. e8.
5. Watson, J.D. and F.H. Crick, *Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid*. Nature, 1953. **171**(4356): p. 737-8.
6. Hurley, L., *DNA and its associated processes as targets for cancer therapy*. Nature reviews. Cancer, 2002. **2**: p. 188-200.
7. Nelson, S.M., L.R. Ferguson, and W.A. Denny, *DNA and the chromosome – varied targets for chemotherapy*. Cell & Chromosome, 2004. **3**(2).
8. Manzanares, I., C. Cuevas, R. Garcia-Nieto, E. Marco, and F. Gago, *Advances in the Chemistry and Pharmacology of Ecteinascidins, A Promising New Class of Anticancer Agents* Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents, 2001. **1**(3): p. 257-276.
9. Kim, Y., J.H. Geiger, S. Hahn, and P.B. Sigler, *Crystal structure of a yeast TBP/TATA-box complex*. Nature, 1993. **365**(6446): p. 512-20.
10. Starr, D.B., B.C. Hoopes, and D.K. Hawley, *DNA bending is an important component of site-specific recognition by the TATA binding protein*. J Mol Biol., 1995. **250**(4): p. 434-46.
11. Grove, A., G.A. Kassavetis, T.E. Johnson, and E.P. Geiduschek, *The RNA polymerase III-recruiting factor TFIIIB induces a DNA bend between the TATA box and the transcriptional start site*. J Mol Biol., 1999. **285**(4): p. 1429-40.
12. Carpenter, M.L., L. Gordon, and P.R. Cook, *The structure of 4-way DNA junctions: specific binding of bis-intercalators with rigid linkers*. Nucleic Acids Research, 1996. **24**(9): p. 1594-1601.
13. Burge, S., G.N. Parkinson, P. Hazel, A.K. Todd, and S. Neidle, *Quadruplex DNA: sequence, topology and structure*. Nucleic Acids Research, 2006. **34**(19): p. 5402-15.
14. Fakhoury, J., G.A. Nimmo, and C. Autexier, *Harnessing telomerase in cancer therapeutics*. Anticancer Agents Med Chem., 2007. **7**(4): p. 475-83.

15. Kelland, L.R., *Telomerase: biology and phase I trials*. Lancet Oncol., 2001. **2**(2): p. 95-102.
16. Mergny, J.L., J.F. Riou, P. Mailliet, M.P. Teulade-Fichou, and E. Gilson, *Natural and pharmacological regulation of telomerase*. Nucleic Acids Research, 2002. **30**(4): p. 839-65.
17. Rezler, E.M., D.J. Bearss, and L.H. Hurley, *Telomeres and telomerases as drug targets*. Curr Opin Pharmacol., 2002. **2**(4): p. 415-23.
18. Rodier, F., S.H. Kim, T. Nijjar, P. Yaswen, and J. Campisi, *Cancer and aging: the importance of telomeres in genome maintenance*. Int J Biochem Cell Biol., 2005. **37**(5): p. 977-90.
19. Olaussen, K.A., K. Dubrana, J. Domont, J.P. Spano, L. Sabatier, and J.C. Soria, *Telomeres and telomerase as targets for anticancer drug development*. Crit Rev Oncol Hematol., 2006. **57**(3): p. 191-214.
20. Pendino, F., I. Tarkanyi, C. Dudognon, J. Hillion, M. Lanotte, J. Aradi, and E. Segal-Bendirdjian, *Telomeres and telomerase: Pharmacological targets for new anticancer strategies?* Curr Cancer Drug Targets, 2006. **6**(2): p. 147-80.
21. Kelland, L., *Targeting the limitless replicative potential of cancer: the telomerase/telomere pathway*. Clin Cancer Res., 2007. **13**(17): p. 4960-3.
22. Finkel, T., M. Serrano, and M.A. Blasco, *The common biology of cancer and ageing*. Nature, 2007. **448**(7155): p. 767-74.
23. Ambrus, A., D. Chen, J. Dai, T. Bialis, R.A. Jones, and D. Yang, *Human telomeric sequence forms a hybrid-type intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel strands in potassium solution*. Nucleic Acids Research, 2006. **34**(9): p. 2723-35.
24. van Dongen, M.J., H.A. Heus, S.S. Wymenga, G.A. van der Marel, J.H. van Boom, and C.W. Hilbers, *Unambiguous structure characterization of a DNA-RNA triple helix by 15N- and 13C-filtered NOESY spectroscopy*. Biochemistry, 1996. **35**(6): p. 1733-9.
25. Haasnoot, C.A., H.P. Westerink, G.A. van der Marel, and J.H. van Boom, *Conformational analysis of a hybrid DNA-RNA double helical oligonucleotide in aqueous solution: d(CG)r(CG)d(CG) studied by 1D- and 2D-1H NMR spectroscopy*. J Biomol Struct Dyn, 1983. **1**(1): p. 131-49.
26. Tew, K.D. and M. Colvin, *Alkylating agents: In Cancer Chemotherapy and Biotherapy*, ed. B.C.y.D. Longo. 1996, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
27. Denny, W.A., *DNA minor groove alkylating agents*. Curr Med Chem. , 2001. **8**(5): p. 533-44.
28. Sawada, N., T. Ishikawa, F. Sekiguchi, Y. Tanaka, and H. Ishitsuka, *X-ray irradiation induces thymidine phosphorylase and enhances the efficacy of*

- capecitabine (Xeloda) in human cancer xenografts*. Clin Cancer Res., 1999. **5**(10): p. 2948-53.
29. Girouard, M., K. Diallo, B. Marchand, S. McCormick, and M. Götte, *Mutations E44D and V118I in the reverse transcriptase of HIV-1 play distinct mechanistic roles in dual resistance to AZT and 3TC*. J Biol Chem., 2003. **278**(36): p. 34403-10.
 30. Marchand, B., K.L. White, J.K. Ly, N.A. Margot, R. Wang, M. McDermott, M.D. Miller, and M. Götte, *Effects of the translocation status of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase on the efficiency of excision of tenofovir*. Antimicrob Agents Chemother., 2007. **51**(8): p. 2911-9.
 31. Götte, M., *Effects of nucleotides and nucleotide analogue inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase in a ratchet model of polymerase translocation*. Curr Pharm Des., 2006. **12**(15): p. 1867-77.
 32. Schreiber, I.R. and E.R. Schiff, *Prevention and treatment of recurrent Hepatitis B after liver transplantation: the current role of nucleoside and nucleotide analogues*. Ann Clin Microbiol Antimicrob., 2006. **5**(8).
 33. Squires, K.E., *An introduction to nucleoside and nucleotide analogues*. Antivir Ther., 2001. **6 Suppl**(3): p. 1-14.
 34. Oliani, C., M. Padovani, P. Manno, D. Barana, M. Falconi, C. Bassi, G. Cavallini, P. Pederzoli, and G.L. Cetto, *Gemcitabine and continuous infusion of 5-fluorouracil in locally advanced and metastatic pancreatic cancer: a phase I-II study*. Anticancer Res., 2004. **24**(3b): p. 2107-12.
 35. Earle, C.C., O. Agboola, J. Maroun, L. Zuraw, and C.C.O.P.G.I.s.G.C.D.S. Group, *The treatment of locally advanced pancreatic cancer: a practice guideline*. Can J Gastroenterol., 2003. **17**(3): p. 161-7.
 36. Dervan, P.B. and B.S. Edelson, *Recognition of the DNA minor groove by pyrrole-imidazole polyamides*. Curr Opin Struct Biol., 2003. **13**(3): p. 284-99.
 37. Dervan, P.B. and R.W. Bürli, *Sequence-specific DNA recognition by polyamides*. Curr Opin Chem Biol., 1999. **3**(6): p. 688-93.
 38. Wemmer, D.E. and P.B. Dervan, *Targeting the minor groove of DNA*. Curr Opin Struct Biol., 1997. **7**(3): p. 355-361.
 39. Oleksy, A., A.G. Blanco, R. Boer, I. Uson, J. Aymami, A. Rodger, M.J. Hannon, and M. Coll, *Molecular Recognition of a Three-Way DNA Junction by a Metallosupramolecular Helicate*. . Angew Chem Int Ed Engl., 2006. **45**(12): p. 1834.
 40. Lerman, L.S., *Structural considerations in the interaction of DNA and acridines*. . J Mol Biol, 1961. **3**: p. 18-30.
 41. Reha, D., M. Kabelác, F. Ryjáček, J. Šponer, J.E. Šponer, M. Elstner, S. Suhai, and P. Hobza, *Intercalators. 1. Nature of stacking interactions between*

- intercalators (*ethidium, daunomycin, ellipticine, and 4',6-diaminide-2-phenylindole*) and DNA base pairs. *Ab initio quantum chemical, density functional theory, and empirical potential study*. J Am Chem Soc., 2002. **124**(13): p. 3366-76.
42. Hanlon, S., *The importance of London dispersion forces in the maintenance of the deoxyribonucleic acid helix*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1996. **23**(6): p. 861-867.
 43. Shui, X., M.E. Peek, L.A. Lipscomb, Q. Gao, C. Ogata, B.P. Roques, C. Garbay-Jaureguiberry, A.P. Wilkinson, and L.D. Williams, *Effects of Cationic Charge on Three-Dimensional Structures of Intercalative Complexes: Structure of a bis-Intercalated DNA Complex Solved by MAD Phasing*. Current Medicinal Chemistry, 2000. **7**: p. 59-71.
 44. Kubar, T., M. Hanus, F. Ryjacek, and P. Hobza, *Binding of cationic and neutral phenanthridine intercalators to a DNA oligomer is controlled by dispersion energy: quantum chemical calculations and molecular mechanics simulations*. Chemistry, 2005. **12**(1): p. 280-90.
 45. Braña, M.F. and A. Ramos, *Naphthalimides as Anticancer Agents: Synthesis and Biological Activity*. Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents, 2001. **1**: p. 237-255.
 46. Guelev, V., M. Cubberley, M. Murr, R.S. Lokey, and B.L. Iverson, *Design, Synthesis and Characterization of Polyintercalating Ligands*. Methods in Enzymology, 2001. **340**: p. 556-572.
 47. Martinez, R. and L. Chacon-Garcia, *The search of DNA-intercalators as antitumoral drugs: what it worked and what did not work*. Curr Med Chem., 2005. **12**(2): p. 127-51.
 48. Gianolio, D.A., J.M. Segismundo, and L.W. McLaughlin, *Tethered naphthalene diimide-based intercalators for DNA triplex stabilization*. Nucleic Acids Research, 2000. **28**(10): p. 2128-34.
 49. Laugâa, P., J. Markovits, A. Delbarre, J.B. Le Pecq, and B.P. Roques, *DNA Tris-Intercalation: First Acridine Trimer with DNA Affinity in the Range of DNA Regulatory Proteins. Kinetic Studie*. Biochemistry, 1985. **24**: p. 5567-5575.
 50. Lee, J., V. Guelev, S. Sorey, D.W. Hoffman, and B.L. Iverson, *NMR structural analysis of a modular threading tetraintercalator bound to DNA*. J Am Chem Soc., 2004. **126**(43): p. 14036-42.
 51. Ueyama, H., M. Takagi, M. Michinori Waki, and S. Takenaka, *DNA binding behavior of peptides carrying acridinyl units: First example of effective poly-intercalation*. Nucleic Acids Research 2001. **Supplement No. 1** p. 163-164.
 52. Gaugain, B., J. Markovits, J.B. Le Pecq, and B.P. Roques, *DNA polyintercalation: comparison of DNA binding properties of an acridine dimer and trimer*. FEBS Lett., 1984. **169**(2): p. 123-6.

53. Yoo, H. and R.L. Rill, *Actinomycin D binding to unstructured, single-stranded DNA*. J Mol Recognit., 2001. **14**(3): p. 145-50.
54. Lipscomb, L.A., F.X. Zhou, S.R. Presnell, R.J. Woo, M.E. Peek, R.R. Plaskon, and L.D. Williams, *Structure of a DNA-Porphyrin Complex*. Biochemistry, 1996. **35**: p. 2818-2823.
55. Wadkins, R.M., E.A. Jares-Erijman, R. Klement, A. Rüdiger, and T.M. Jovin, *Actinomycin D Binding to Single-stranded DNA: Sequence Specificity and Hemi-intercalation Model from Fluorescence and 1H NMR Spectroscopy*. J. Mol. Biol., 1996. **262**: p. 53-68.
56. Siegmund, K., S. Maheshwary, S. Narayanan, W. Connors, M. Riedrich, M. Printz, and C. Richert, *Molecular details of quinolone-DNA interactions: solution structure of an unusually stable DNA duplex with covalently linked nalidixic acid residues and non-covalent complexes derived from it*. Nucleic Acids Research, 2005. **33**(15): p. 4838-48.
57. Bendic, C., M. Enache, and E. Volanschi, *Analysis of actinomycin D-DNA model complexes using a quantum-chemical criterion: Mulliken overlap populations*. Journal of Molecular Graphics and Modelling, 2005. **24**: p. 10-16.
58. Adams, A., J.M. Guss, C.A. Collyer, W.A. Denny, and L.P. Wakelin, *A novel form of intercalation involving four DNA duplexes in an acridine-4-carboxamide complex of d(CGTACG)(2)*. Nucleic Acids Research, 2000. **28**(21): p. 4244-53.
59. Sischka, A., K. Toensing, R. Eckel, S.D. Wilking, N. Sewald, R. Ros, and D. Anselmetti, *Molecular Mechanisms and Kinetics between DNA and DNA Binding Ligands*. Biophysical Journal 2005. **88**: p. 404-411.
60. Sartorius, J. and H.-J. Schneider, *Intercalation mechanisms with ds-DNA: binding modes and energy contributions with benzene, naphthalene, quinoline and indole derivatives including some antimalarials*. J. Chem. Soc., Perkin Trans., 1997. **2**: p. 2319-2327.
61. Kagemoto, A., A. Kunihiro, and Y. Baba, *Thermodynamic Studies on Interactions Between DNA and Dye*. Thermochemica Acta, 1994. **242**: p. 65-75.
62. Chaires, J.B., *A thermodynamic signature for drug-DNA binding mode*. Arch of Biochem and Biophys., 2006. **453**(1): p. 26-31.
63. Berge, T., N.S. Jenkins, R.B. Hopkirk, M.J. Waring, J.M. Edwardson, and R.M. Henderson, *Structural perturbations in DNA caused by bis-intercalation of ditercalinium visualised by atomic force microscopy*. Nucleic Acids Research, 2002. **30**(13): p. 2980-6.
64. Mathews, C.K., K.E. van Holde, and K.G. Ahern, *Bioquímica*. 3ª edición ed. 2002: Pearson Educación S.A.
65. Neidle, S., L.H. Pearl, and J.V. Skellydna, *DNA structure and perturbation by drug binding*. Biochem. J., 1987. **243**: p. 1-13.

66. Barcelo, F., G. Muzard, R. Mendoza, B. Révet, B.P. Roques, and J.B. Le Pecq, *Removal of DNA curving by DNA ligands: gel electrophoresis study*. Biochemistry, 1991. **30**(20): p. 4863-73.
67. Morgan, A.R., D.H. Evans, J.S. Lee, and D.E. Pulleyblank, *Review: ethidium fluorescence assay. Part II. Enzymatic studies and DNA-protein interactions*. Nucleic Acids Research, 1979. **7**(3): p. 571-94.
68. Persil, O. and N.V. Hud, *Harnessing DNA intercalation*. Trends in Biotechnology 2007. **25**(10).
69. Lepecq, J.B. and C. Paoletti, *A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids Physical-Chemical characterization* Journal of Molecular Biology 1967. **27**(1): p. 87-106.
70. Morgan, A.R., J. Lee, D.E. Pulleyblank, N.L. Murray, and D.H. Evans, *Review: ethidium fluorescence assays. Part 1. Physicochemical studies*. Nucleic Acids Research, 1979. **7**(3): p. 547-69.
71. Jenkins, F.J., *Basic methods for the detection of PCR products*. PCR Methods Appl., 1994. **3**(5): p. 77-82.
72. Chan, E.Y., *et al.*, *Detection of Fluorescent Site-Specific Tags DNA Mapping Using Microfluidic Stretching and Single-Molecule*. Genome Res., 2004. **14**: p. 1137-1146
73. Laib, S., M. Rankl, T. Ruckstuhl, and S. Seeger, *Sizing of single fluorescently stained DNA fragments by scanning microscopy*. Nucleic Acids Research, 2003. **31**(22): p. e138.
74. Rye, H.S., S. Yue, D.E. Wemmer, M.A. Quesada, R.P. Haugland, R.A. Mathies, and A.N. Glazer, *Stable fluorescent complexes of double-stranded DNA with bis-intercalating asymmetric cyanine dyes: properties and applications*. Nucleic Acids Research, 1992. **20**(11): p. 2803-2812.
75. Rathenberg, J., T. Nevian, and V. Witzemann, *High-efficiency transfection of individual neurons using modified electrophysiology techniques*. Journal of Neuroscience Methods, 2003. **126**: p. 91-98.
76. Ding, B., M.O. Kwon, R. Hammond, and R. Owens, *Cell-to-cell movement of potato spindle tuber viroid*. The Plant Journal, 1997. **12**(4): p. 931-936.
77. Golzio, M., J. Teissie, and M.P. Rols, *Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery*. Proc Natl Acad Sci U S A. , 2002. **99**(3): p. 1292-7.
78. Mangelot, S., S. Keller, and J. Rädler, *Transport of nucleosome core particles in semidilute DNA solutions*. Biophys J. , 2003. **85**(3): p. 1817-25.
79. Welch, J.J., F.J. Rauscher, 3rd., , and T.A. Beerman, *Targeting DNA-binding drugs to sequence-specific transcription factor.DNA complexes*. Differential

effects of intercalating and minor groove binding drugs. J Biol Chem., 1994. **269**(49): p. 31051-8.

80. Gniazdowski, M., W.A. Denny, S.M. Nelson, and M. Czyz, *Effects of anticancer drugs on transcription factor-DNA interactions.* Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2005. **9**(3): p. 471-489.
81. Burckhardt, G., A. Walter, H. Triebel, K. Storl, H. Simon, J. Storl, A. Opitz, E. Roemer, and C. Zimmer, *Binding of 2-azaanthraquinone derivatives to DNA and their interference with the activity of DNA topoisomerases in vitro.* Biochemistry, 1998. **37**(14): p. 4703-11.
82. George, J.W., S. Ghate, S.W. Matson, and J.M. Besterman, *Inhibition of DNA helicase II unwinding and ATPase activities by DNA-interacting ligands. Kinetics and specificity.* J Biol Chem., 1992. **267**(15): p. 10683-9.
83. Bachur, N.R., F. Yu, R. Johnson, R. Hickey, Y. Wu, and L. Malkas, *Helicase inhibition by anthracycline anticancer agents.* Mol Pharmacol., 1992. **41**(6): p. 993-8.
84. Bachur, N.R., R. Johnson, F. Yu, R. Hickey, N. Applegren, and L. Malkas, *Antihelicase action of DNA-binding anticancer agents: relationship to guanosine-cytidine intercalator binding.* Mol Pharmacol., 1993. **44**(5): p. 1064-9.
85. Larsen, A.K., A.E. Escargueil, and A. Skladanowski, *Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy.* Pharmacol Ther., 2003. **99**(2): p. 167-81.
86. Brow, J.M., C.R. Pleatman, and U. Bierbach, *Cytotoxic acridinylthiourea and its platinum conjugate produce enzyme-mediated DNA strand breaks.* Bioorg Med Chem Lett., 2002. **12**(20): p. 2953-5.
87. Li, Q.Y., Y.G. Zu, R.Z. Shi, and L.P. Yao, *Review Camptothecin: Current Perspectives.* Curr Med Chem., 2006. **13**(17): p. 2021-39.
88. Webb, M.R. and S.E. Ebeler, *Comparative analysis of topoisomerase IB inhibition and DNA intercalation by flavonoids and similar compounds: structural determinates of activity.* Biochem. J., 2004. **384**: p. 527-541.
89. Crow, R.T. and D.M. Crothers, *Inhibition of topoisomerase I by anthracycline antibiotics: evidence for general inhibition of topoisomerase I by DNA-binding agents.* J Med Chem, 1994. **37**(19): p. 3191-4.
90. Bailly, C., *Topoisomerase I Poisons and Suppressors as Anticancer Drugs.* Current Medicinal Chemistry, 2000. **7**: p. 39-58.
91. Binaschi, M., G. Capranico, L. Dal Bo, and F. Franco Zunino, *Relationship between Lethal Effects and Topoisomerase II-Mediated Double-Stranded DNA Breaks Produced by Anthracyclines with Different Sequence Specificity.* Molecular Pharmacology, 1997. **51**: p. 1053-1059

92. Monnot, M., O. Mauffret, V. Simon, E. Lescot, B. Psaume, J.M. Saucier, M. Charra, J.J. Belehradek, and S. Fermandjian, *DNA-drug recognition and effects on topoisomerase II-mediated cytotoxicity. A three-mode binding model for ellipticine derivatives*. J Biol Chem., 1991. **266**(3): p. 1820-9.
93. Arimondo, P., C. Boukarim, C. Bailly, D. Dauzonne, and C. Monneret, *Design of two etoposide-amsacrine conjugates: topoisomerase II and tubuline polymerization inhibition and relation to cytotoxicity*. Anticancer Drug Des., 2000. **15**(6): p. 413-21.
94. Lemke, K., M. Wojciechowski, W. Laine, C. Bailly, P. Colson, M. Baginski, A.K. Larsen, and A. Skladanowski, *Induction of unique structural changes in guanine-rich DNA regions by the triazoloacridone C-1305, a topoisomerase II inhibitor with antitumor activities*. Nucleic Acids Research, 2005. **33**(18): p. 6034-6047.
95. Redinbo, M.R., L. Stewart, P. Kuhn, J.J. Champoux, and W. Hol, *Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA*. Science, 1998. **279**(5356): p. 1504-13.
96. Portugal, J., B. Martin, A. Vaquero, N. Ferrer, S. Villamarin, and W. Priebe, *Analysis of the effects of daunorubicin and WP631 on transcription*. Curr Med Chem., 2001. **8**(1): p. 1-8.
97. Bailly, C., *et al.*, *DNA intercalation, topoisomerase II inhibition and cytotoxic activity of the plant alkaloid neocryptolepine*. Anticancer Drug Des., 2000. **15**(3): p. 191-201.
98. Sinha, R., M. Hossain, and G.S. Kumar, *RNA targeting by DNA binding drugs: Structural, conformational and energetic aspects of the binding of quinacrine and DAPI to A-form and H(L)-form of poly(rC).poly(rG)*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1770**(12): p. 1636-50.
99. Goodell, J.R., A.A. Madhok, H. Hiasa, and D.M. Ferguson, *Synthesis and evaluation of acridine- and acridone-based anti-herpes agents with topoisomerase activity*. Bioorg Med Chem., 2006. **14**(16): p. 5467-80.
100. Goodell, J.R., F. Puig-Basagoiti, B.M. Forshey, P.Y. Shi, and D.M. Ferguson, *Identification of compounds with anti-West Nile Virus activity*. J Med Chem., 2006. **49**(6): p. 2127-37.
101. Chin, K., F. Chen, and S. Chou, *Solution structure of the ActD-5'-CCGTT3GTGG-3' complex: drug interaction with tandem G-T mismatches and hairpin loop backbone*. Nucleic Acids Research, 2003. **31**(10): p. 2622-2629.
102. Arjmand, F., B. Mohani, and S. Ahmad, *Synthesis, antibacterial, antifungal activity and interaction of CT-DNA with a new benzimidazole derived Cu(II) complex*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2005. **40**: p. 1103-1110.
103. Jonckers, T.H., *et al.*, *Synthesis, cytotoxicity, and antiplasmodial and antitrypanosomal activity of new neocryptolepine derivatives*. J Med Chem. , 2002. **45**(16): p. 3497-3508.

104. Onyeibor, O., *et al.*, *Synthesis of some cryptolepine analogues, assessment of their antimalarial and cytotoxic activities, and consideration of their antimalarial mode of action.* J Med Chem, 2005. **48**(7): p. 2701-9
105. Mansilla, S., W. Priebe, and J. Portugal, *Transcriptional changes facilitate mitotic catastrophe in tumour cells that contain functional p53.* Eur J Pharmacol., 2006. **540**(1-3): p. 34-45.
106. Braña, M.F., M. Cacho, A. Gradillas, B. de Pascual-Teresa, and A. Ramos, *Intercalators as Anticancer Drugs* Current Pharmaceutical Design, 2001. **7**(17(36)): p. 1745-1780.
107. Cao, R., W. Peng, Z. Wang, and A. Xu, *beta-Carboline alkaloids: biochemical and pharmacological functions.* Curr Med Chem., 2007. **14**(4): p. 479-500.
108. Garbay-Jaureguiberry, C., M.C. Barsi, A. Jacquemin-Sablon, J.B. Le Pecq, and B.P. Roques, *Synthesis and biological activity of new dimers in the 7H-pyrido[4,3-c] carbazole antitumor series.* J Med Chem, 1992. **35**(1): p. 72-81.
109. Fellous, R., D. Coulaud, I. el Abed, B.P. Roques, J.B. Le Pecq, E. Delain, and A. Gouyette, *Cytoplasmic accumulation of ditercalinium in rat hepatocytes and induction of mitochondrial damage.* Cancer Res., 1988. **48**(22): p. 6542-9.
110. Esnault, C., S.C. Brown, E. Segal-Bendirdjian, D. Coulaud, Z. Mishal, B.P. Roques, and J.B. Le Pecq, *Selective alteration of mitochondrial function by Ditercalinium (NSC 335153), a DNA bisintercalating agent.* Biochem Pharmacol., 1990. **39**(1): p. 109-22.
111. Boekelheide, V. and W.G. Gall, *A Synthesis of Quinolizinium and Dehydroquinolizinium Derivatives.* J Am Chem Soc., 1954. **76**(7): p. 1832 - 1836.
112. Henry, T.A., *The Plant Alkaloids.* 4th ed. 1949, Philadelphia: The Blakiston. Co.
113. Grycová, L., J. Dostál, and R. Marek, *Quaternary protoberberine alkaloids.* Phytochemistry, 2007. **68**: p. 150–175.
114. Wang, L.-K., B.D. Rogers, and S.M. Hecht, *Inhibition of Topoisomerase I Function by Coralyne and 5,6-Dihydrocoralyne.* Chem. Res. Toxicol., 1996. **9**(1): p. 75-83.
115. Cortazar, T.M., G.H. Coombs, and J. Walker, *Leishmania panamensis: comparative inhibition of nuclear DNA topoisomerase II enzymes from promastigotes and human macrophages reveals anti-parasite selectivity of fluoroquinolones, flavonoids and pentamidine.* Exp Parasitol., 2007. **116**(4): p. 475-82.
116. Jean-Moreno, V., R. Rojas, D. Goyeneche, G.H. Coombs, and J. Walker, *Leishmania donovani: Differential activities of classical topoisomerase inhibitors and antileishmanials against parasite and host cells at the level of DNA topoisomerase I and in cytotoxicity assays.* Exp Parasitol., 2006. **112**(1): p. 21-30.

117. Martín, M.A., A.S. Bouin, S. Muñoz-Botella, and B. del Castillo, *A study of the interaction of polycyclic derivatives of azaquinolizinium salts with DNA*. Polycyclic Aromatic Compounds, 2002. **22**: p. 37-53.
118. Lee, J.S., L.J. Latimer, and K.J. Hampel, *Coralyn binds tightly to both T*A*T- and C*G*C+-Containing DNA Triplexes*. Biochemistry, 1993. **32**: p. 5591-5597.
119. Wilson, W.D., A.N. Gough, J.J. Doyle, and M.W. Davidson, *Coralyn. Intercalation with DNA as a possible mechanism of antileukemic action*. J Med Chem., 1976. **19**(10): p. 1261-3.
120. Solis-Maldonado, C., R. Quintanilla-Licea, R. Tamez-Guerra, C. Rodríguez-Padilla, and R. Gomez-Flores, *Differential effects of synthetic indoloquinolizines on in vitro rat lymphocyte and macrophage functions*. International Immunopharmacology, 2003. **3**: p. 1261-1271.
121. Lipińska, T.M., *Total synthesis of new indolo[2,3-a]quinolizine alkaloids sempervirine type, potential pharmaceuticals*. Tetrahedron, 2006. **62**: p. 5736-5747.
122. Beljanski, M. and M.S. Beljanski, *Three alkaloids as selective destroyers of cancer cells in mice. Synergy with classic anticancer drugs*. Oncology, 1986. **43**(3): p. 198-203.
123. Seshagiri, V., *et al.*, *Flavopereirine derivatives for cancer therapy*. 2005
124. Matía, M.P., J. Ezquerro, J.L. García, J.J. Vaquero, and J. Alvarez-Builla, *New uses of westphal condensation: synthesis of flavocorylene and related indolo[2,3-a]quinolizinium salts*. Tetrahedron Lett., 1991. **32**(51): p. 7575-7578.
125. Cossio, F.P., A. Arrieta, V.L. Cebolla, L. Membrado, J. Vela, R. Garriga, and M.P. Domingo, *Berberine cation: A fluorescent chemosensor for alkanes and other low-polarity compounds. An explanation of this phenomenon*. Org. Lett., 2000. **2**(15): p. 2311-3.
126. Shugar, D., *Protein kinase inhibitors--potential chemotherapeutic agents*. Acta Biochim Pol., 1995. **42**(4): p. 405-18.
127. Noël, S., P.O. Strale, L. Dannhoffer, M. Wilke, H. Dejonge, C. Rogier, Y. Mettey, and F. Becq, *Stimulation of salivary secretion in vivo by CFTR potentiators in Cfr(+/-) and Cfr(-/-) mice*. J Cyst Fibros., 2007.
128. Becq, F., *et al.*, *Development of substituted Benzo[c]quinolizinium compounds as novel activators of the cystic fibrosis chloride channel*. J Biol Chem., 1999. **274**(39): p. 27415-25.
129. Vandebrouck, C., P. Melin, C. Norez, R. Robert, C. Guibert, Y. Mettey, and F. Becq, *Evidence that CFTR is expressed in rat tracheal smooth muscle cells and contributes to bronchodilation*. Respir Res., 2006. **7**: p. 113.

130. Marivingt-Mounir, C., *et al.*, *Synthesis, SAR, crystal structure, and biological evaluation of benzoquinoliziniums as activators of wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channels*. J Med Chem., 2004. **47**(4): p. 962-72.
131. Sasaki, S., T. Kanda, N. Ishibashi, F. Yamamoto, T. Haradahira, T. Okauchi, J. Meda, K. Suzuki, and M. Maeda, *4,5,9,10-Tetrahydro-1,4-ethanobenz[b]quinolizine as a prodrug for its quinolizinium cation as a ligand to the open state of the TCP-binding site of NMDA receptors*. Bioorg Med Chem Lett., 2001. **11**(4): p. 519-21.
132. Earley, W.G., *et al.*, *Novel benzo[b]quinolizinium cations as uncompetitive N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) antagonists: the relationship between log D and agonist independent (closed) NMDA channel block*. J Med Chem., 1995. **38**(18): p. 3586-92.
133. Mallamo, J.P., *et al.*, *Identification, synthesis, and characterization of a unique class of N-methyl-D-aspartate antagonists. The 6,11-ethanobenzo[b]quinolizinium cation*. J Med Chem., 1994. **37**(26): p. 4438-48.
134. Flores-Soto, M.E., J. Bañuelos-Pineda, S. Orozco-Suárez, R. Schliebs, and C. Beas-Zárate, *Neuronal damage and changes in the expression of muscarinic acetylcholine receptor subtypes in the neonatal rat cerebral cortical upon exposure to sparteine, a quinolizidine alkaloid*. Int J Dev Neurosci., 2006. **24**(6): p. 401-10.
135. Dehecchi, M.C., *et al.*, *MPB-07 reduces the inflammatory response to Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis bronchial cells*. Am J Respir Cell Mol Biol., 2007. **36**(5): p. 615-24.
136. Yang, C.W., T.H. Chuang, P.L. Wu, W.H. Huang, and S.J. Lee, *Anti-inflammatory effects of 7-methoxycryptopleurine and structure-activity relations of phenanthroindolizidines and phenanthroquinolizidines*. Biochem Biophys Res Commun., 2007. **354**(4): p. 942-8.
137. Suh D and C.J. B, *Criteria for the mode of binding of DNA binding agents*. Bioorg Med Chem., 1995. **3**(6): p. 723-8.
138. Kan, Y., B. Armitage, and G.B. Schuster, *Selective stabilization of triplex DNA by anthraquinone sulfonamide derivatives*. Biochemistry, 1997. **36**(6): p. 1461-6.
139. Molina, A., J. Vaquero, J. Garcia-Navio, J. Alvarez-Builla, B. de Pascual-Teresa, F. Gago, M. Rodrigo, and M. Ballesteros, *Synthesis and DNA Binding Properties of γ -Carbolinium Derivatives and Benzologues*. J. Org. Chem., 1996. **61**: p. 5587-5599.
140. Pastor, J., J.G. Siro, J.L. García-Navío, J.J. Vaquero, J. Alvarez-Builla, F. Gago, B. de Pascual-Teresa, M. Pastor, and M.M. Rodrigo, *Azino-Fused Benzimidazolium Salts as DNA Intercalating Agents*. J. Org. Chem., 1997. **62**: p. 5476-5483.

141. Molina, A., J.J. Vaquero, J.L. Garcia-Navio, J. Alvarez-Builla, d.P.-T. B, F. Gago, and R.M. M, *Novel DNA Intercalators Based on the Pyridazino[1*ϕ*,6*ϕ*:1,2*]pyrido[4,3-*b*]indol-5-inium System. J. Org. Chem., 1999. **64**: p. 3907-3915.
142. Britten, R.J. and R.B. Roberts, *High-resolution density gradient sedimentation analysis*. Science, 1960. **131**(3392): p. 32-33.
143. Wrenn, C.K. and B.S. Katzenellenbogen, *Cross-linking of estrogen receptor to chromatin in intact MCF-7 human breast cancer cells: optimization and effect of ligand*. Mol Endocrinol., 1990. **4**(11): p. 1647-54.
144. Hinton, D.M. and V.C. Bode, *Purification of Closed Circular x Deoxyribonucleic Acid and Its Sedimentation Properties as a Function of Sodium Chloride Concentration and Ethidium Binding*. J Biol Chem., 1975. **250**(3): p. 1071-1079.
145. Yoneda, M. and F.J. Bollum, *Deoxynucleotide-polymerizing Enzymes of Calf Thymus Gland. I: Large Scale Purification of Terminal and Replicative Deoxynucleotidyl Transferases*. J Biol Chem., 1965. **240**(8): p. 3385-3391.
146. Garcia, M.A. and B. de Pascual-Teresa, *Técnicas empleadas para el estudio de la interacción entre agentes antitumorales y el DNA*. Oncología (Barc.), 2004. **27**(2): p. 33-43.
147. Rodger, A. and B. Nordén, *Circular Dichroism and Linear Dichroism*. 1997, USA: Oxford University Press.
148. Lah, J. and G. Vesnaver, *Energetic diversity of DNA minor-groove recognition by small molecules displayed through some model ligand-DNA systems*. J Mol Biol., 2004. **342**(1): p. 73-89.
149. Williams, R.E., P.P. Lurquin, and V.L. Seligy, *Circular Dichroism of Avian-Erythrocyte Chromatin and Ethidium Bromide Bound to Chromatin*. Eur. J. Biochem., 1972. **29**: p. 426-432.
150. Martinez, V., *et al.*, *Benzo[*f*]azino[2,1-*a*]phthalazinium cations: novel DNA intercalating chromophores with antiproliferative activity*. J Med Chem, 2004. **47**(5): p. 1136-48.
151. Marky, L.A., K.S. Blumenfeld, and K.J. Breslauer, *Calorimetric and spectroscopic investigation of drug – DNA interactions. I. The binding of netropsin to poly d(AT)*. Nucleic Acids Research, 1983. **11**(9): p. 2857–2870.
152. Cooper, A., C.M. Johnson, J.H. Lakey, and M. Nöllmann, *Heat does not come in different colours: entropy-enthalpy compensation, free energy windows, quantum confinement, pressure perturbation calorimetry, solvation and the multiple causes of heat capacity effects in biomolecular interactions*. Biophys Chem., 2001. **93**((2-3)): p. 215-30.

153. Haq, I., J.E. Ladbury, B.Z. Chowdhry, T.C. Jenkins, and J.B. Chaires, *Specific binding of hoechst 33258 to the d(CGCAAATTTGCG)₂ duplex: calorimetric and spectroscopic studies*. J Mol Biol., 1997. **271**(2): p. 244-57.
154. Buurma, N.J. and I. Haq, *Advances in the analysis of isothermal titration calorimetry data for ligand–DNA interactions*. Methods 2007. **42**: p. 162-172.
155. Jelesarov, I. and H.R. Bosshard, *Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition*. J. Mol. Recognit., 1999. **12**: p. 3-18.
156. Dragan, A.I. and P.L. Privalov, *Unfolding of a leucine zipper is not a simple two-state transition*. J Mol Biol., 2002. **321**(5): p. 891-908.
157. Leng, F., J.B. Chaires, and M.J. Waring, *Energetics of echinomycin binding to DNA*. Nucleic Acids Research, 2003. **31**(21): p. 6191-6197.
158. Tiselius, A., *A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures*. Trans. Faraday Soc, 1937. **33**: p. 524-531.
159. Tawar, U., A.K. Jain, R. Chandra, Y. Singh, B.S. Dwarakanath, N.K. Chaudhury, L. Good, and V. Tandon, *Minor groove binding DNA ligands with expanded A/T sequence length recognition, selective binding to bent DNA regions and enhanced fluorescent properties*. Biochemistry, 2003. **42**(45): p. 13339-46.
160. Chaltin, P., F. Borgions, A. van Aerschot, and P. Herdewijn, *Comparison of library screening techniques used in the development of dsDNA ligands*. Bioorg Med Chem Lett., 2003. **13**(1): p. 47-50.
161. Kazlauskas, A., L. Poellinger, and I. Pongratz, *Evidence That the Co-chaperone p23 Regulates Ligand Responsiveness of the Dioxin (Aryl Hydrocarbon) Receptor*. J Biol Chem., 1999. **274**(19): p. 13519-13524.
162. Hellman, L.M. and M.G. Fried, *Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions*. Nature Protocols, 2007. **2**(8): p. 1849-61.
163. Hamdan, I., G. Skellern, and R.D. Waigh, *Use of capillary electrophoresis in the study of ligand–DNA interactions*. Nucleic Acids Research, 1998. **26**(12): p. 3053-3058.
164. Guttman, A. and N. Cooke, *Capillary Gel Affinity Electrophoresis of DNA Fragments*. Anal. Chem., 1991. **63**: p. 2038-2042.
165. Bailly, C. and M.J. Waring, *Comparison of different footprinting methodologies for detecting binding sites for a small ligand on DNA*. J Biomol Struct Dyn., 1995. **12**(4): p. 869-98.
166. Portugal, J., *Footprinting analysis of sequence-specific DNA-drug interactions*. Chem Biol Interact., 1989. **71**(4): p. 311-24.

167. Bailly, C., G. Chessari, C. Carrasco, A. Joubert, J. Mann, W.D. Wilson, and S. Neidle, *Sequence-specific minor groove binding by bis-benzimidazoles: water molecules in ligand recognition*. Nucleic Acids Research, 2003. **31**(5): p. 1514-1524.
168. Sandaltzopoulos, R. and P.B. Becker, *Solid phase DNase I footprinting: quick and versatile*. Nucleic Acids Research, 1994. **22**(8): p. 1511 -1512.
169. Ellis, T., D.A. Evans, C.R.H. Martin, and J. Hartley, *A 96-well DNase I footprinting screen for drug-DNA interactions*. Nucleic Acids Research, 2007. **35**(12): p. e89.
170. Wilson, D.O., P. Johnson, and B.R. McCord, *Nonradiochemical DNase I footprinting by capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2001. **22**(10): p. 1979-86.
171. Volckova, E., L.P. Dudones, and R.N. Bose, *HPLC determination of binding of cisplatin to DNA in the presence of biological thiols: implications of dominant platinum-thiol binding to its anticancer action*. Pharm Res., 2002. **19**(2): p. 124-31.
172. Diakos, C.I., R.R. Fenton, and T.W. Hambley, *DNA-binding and molecular mechanics modelling studies of the bulky chiral platinum(II) complex [PtCl₂(mepyr)] (mepyr = N-methyl-2-aminomethylpyrrolidine)*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2006. **100**: p. 1965-1973.
173. Vidal-Madjar, C., C.C. Florentina, I. Gherghi, A. Jaulmes, A. Pantazaki, and M. Taverna, *Direct zonal liquid chromatographic method for the kinetic study of actinomycin-DNA binding*. J Chromatogr A, 2004. **1042**(1-2): p. 15-22.
174. Wang, P. and H.K. Lee, *Recent applications of high-performance liquid chromatography to the analysis of metal complexes*. Journal of Chromatography A., 1997. **789**: p. 437-451.
175. Kapur, A., J.L. Beck, and M.M.A. Sheil, *Observation of daunomycin and nogalamycin complexes with duplex DNA using electrospray ionisation mass spectrometry*. Rapid Commun. Mass Spectrom, 1999. **13**(24): p. 2489-97.
176. Beck, J.L., M.L. Colgrave, S.F. Ralph, and M.M. Sheil, *Electrospray ionization mass spectrometry of oligonucleotide complexes with drugs, metals, and proteins*. Mass Spectrom Rev., 2001. **20**(2): p. 61-87.
177. Rosu, F., V. Gabelica, C. Houssier, and E. de Pauw, *Determination of affinity, stoichiometry and sequence selectivity of minor groove binder complexes with double-stranded oligodeoxynucleotides by electrospray ionization mass spectrometry*. Nucleic Acids Research, 2002. **30**(16): p. e82.
178. Reyzer, M.L., J.S. Brodbelt, S.M. Kerwin, and D. Kumar, *Evaluation of complexation of metal-mediated DNA-binding drugs to oligonucleotides via electrospray ionization mass spectrometry*. Nucleic Acids Research, 2001. **29**(21): p. e103-3.

179. Fenn, J.B., M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, and C.M. Whitehouse, *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. Science, 1989. **246**(4926): p. 64-71.
180. Mano, N. and J. Goto, *Biomedical and Biological Mass Spectrometry*. Analytical Sciences, 2003. **19**(1): p. 3-14.
181. Han, X. and X. Gao, *Sequence specific recognition of ligand-DNA complexes studied by NMR*. Curr Med Chem., 2001. **8**(5): p. 551-81.
182. Szabo, A., L. Stolz, and R. Granzow, *Surface plasmon resonance and its use in biomolecular interaction analysis (BIA)*. Current Opinion in Structural Biology, 1995. **5**: p. 699-705.
183. Ciolkowski, M.L., M.M. Fang, and M.E. Lund, *A surface plasmon resonance method for detecting multiple modes of DNA-ligand interactions*. J Pharm Biomed Anal., 2000. **22**(6): p. 1037-45.
184. Tanious, F.A., B. Nguyen, and W.D. Wilson, *Biosensor-Surface Plasmon Resonance Methods for Quantitative Analysis of Biomolecular Interactions*. Methods Cell Biol., 2008. **84**: p. 53-77.
185. Gambari, R., *Biospecific interaction analysis: a tool for drug discovery and development*. Am J Pharmacogenomics, 2001. **1**(2): p. 119-35.
186. Gambari, R., G. Feriotto, C. Rutigliano, N. Bianchi, and C. Mischiati, *Biospecific interaction analysis (BIA) of low-molecular weight DNA-binding drugs*. J Pharmacol Exp Ther., 2000. **294**(1): p. 370-7.
187. Coury, J.E., L. Mcfail-Isom, L.D. Williams, and L.A. Bot-Tomley, *A novel assay for drug-DNA binding mode, affinity, and exclusion number: Scanning force microscopy*. Proc. Natl. Acad. Sci., 1996. **93**: p. 12283-12286.
188. Pope, L.H., M.C. Davies, C.A. Laughton, C.J. Roberts, S.J.B. Tendler, and P.M. Williams, *Atomic force microscopy studies of intercalation-induced changes in plasmid DNA tertiary structure*. Journal of Microscopy, 2000. **199**(1): p. 68-78.
189. Edwardson, J.M. and R.M. Henderson, *Atomic force microscopy and drug discovery*. Drug Discov. Today, 2004. **9**(2): p. 64-71.
190. Gao, Q., L.D. Williams, M. Egli, D. Rabinovich, S.L. Chen, G.J. Quigley, and A. Rich, *Drug-induced DNA repair: X-ray structure of a DNA-ditercalinium complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(6): p. 2422-6.
191. Peek, M.E. and L.D. Williams, *X-Ray Crystallography of DNA-Drug Complexes*. Methods Enzimol. , 2001. **340**: p. 282-290.
192. McPherson, A., *Preparation and Analysis of Protein Crystals*, ed. R.E.K.P. Co. 1989.
193. Bloomfield, V.A., *DNA condensation by multivalent cations*. Biopolymers, 1997. **44**(3): p. 269-282.

194. Wang, A.H.-J. and Y.G. Gao, *Crystallization of oligonucleotides and their complexes with antitumor drugs*. Methods, A Companion to Methods in Enzymology, 1990: p. 91-99.
195. Wahl, M.C. and M. Sundaralingam, *New crystal structures of nucleic acids and their complexes*. Current Opinion in Structural Biology 1995. **5**: p. 282-295.
196. Reynisson, J., G.B. Schuster, S.B. Howerton, L.D. Williams, R.N. Barnett, C.L. Cleveland, U. Landman, N. Harrit, and J.B. Chaires, *Intercalation of trioxatriangulenium ion in DNA: binding, electron transfer, x-ray crystallography, and electronic structure*. J Am Chem Soc., 2003. **125**(8): p. 2072-83.
197. de Pascual-Teresa, B., J. Gallego, A.R. Ortiz, and F. Gago, *Molecular dynamics simulations of the bis-intercalated complexes of ditercalinium and Flexi-Di with the hexanucleotide d(GCGCGC)2: theoretical analysis of the interaction and rationale for the sequence binding specificity*. J Med Chem., 1996. **39**(24): p. 4810-24.
198. Gago, F., *Modelling and Simulation: a Computational Perspective in Anticancer Drug Discovery*. Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents, 2004. **4**: p. 401-403.
199. James, P.L., E.E. Merkina, A.I. Khalaf, C.J. Suckling, R.W. Waigh, T. Brown, and K.R. Fox, *DNA sequence recognition by an isopropyl substituted thiazole polyamide*. Nucleic Acids Research, 2004. **32**(11): p. 3410-3417.
200. Cantor, C.R. and P.R. Schimmel, *Biophysical chemistry, Part III: The Behavior of Biological Macromolecules*. 1980: WH Freeman. 1132-1161.
201. Spink, C.H. and S.E. Wellman, *Thermal denaturation as tool to study DNA-ligand interactions*. Methods in Enzymology, 2001. **340**: p. 193-211.
202. Tse, W.C., T. Ishii, and D.L. Boger, *Comprehensive High-Resolution Analysis of Hairpin Polyamides Utilizing a Fluorescent Intercalator Displacement (FID) Assay*. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2003. **11**: p. 4479-4486.
203. Boger, D.L. and W.C. Tse, *Thiazole Orange as the Fluorescent Intercalator in a High Resolution FID Assay for Determining DNA Binding Affinity and Sequence Selectivity of Small Molecules*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2001. **9**: p. 2511-2518.
204. Baguley, B.C., W.A. Denny, G.J. Atwell, and B.F. Cain, *Potential Antitumor Agents. 34. Quantitative Relationships between DNA Binding and Molecular Structure for 9-Anilinoacridines Substituted in the Anilino Ring*. J. Med. Chem., 1981. **24**(2): p. 170-177.
205. Lewis, M.A. and E.C. Long, *Fluorescent intercalator displacement analyses of DNA binding by the peptide-derived natural products netropsin, actinomycin, and bleomycin*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2006. **14**: p. 3481-3490.

206. Van Dyke, M.W., N. Van Dyke, and G. Sunavala-Dossabhoy, *REPSA: general combinatorial approach for identifying preferred ligand-DNA binding sequences*. *Methods*, 2007. **42**(2): p. 118-27.
207. Levine, H.A. and M. Nilsen-Hamilton, *A mathematical analysis of SELEX*. *Comput Biol Chem*, 2007. **31**(1): p. 11-35.
208. Gopinath, S.C.B., *Methods developed for SELEX*. *Anal Bioanal Chem*, 2007. **387**: p. 171-182
209. James, W., *Nucleic acid and polypeptide aptamers: a powerful approach to ligand discovery*. *Current Opinion in Pharmacology*, 2001. **1**: p. 540-546.
210. Ren, J. and J.B. Chaires, *Sequence and structural selectivity of nucleic acid binding ligands*. *Biochemistry*, 1999. **38**(49): p. 16067-75.
211. Chavelas, E.A., R.A. Zubillaga, N.O. Pulido, and E. García-Hernández, *Multithermal titration calorimetry: A rapid method to determine binding heat capacities*. *Biophysical Chemistry*, 2006. **120**: p. 10-14.
212. Astbury Centre for Structural Molecular Biology. *Biacore Surface Plasmon Resonance (SPR)*. 2004 [cited; Available from: http://www.astbury.leeds.ac.uk/facil/SPR/spr_intro2004.htm].
213. Fox, K.R., *Methods in Molecular Biology: Drug-DNA Interaction Protocols*. 1997, New Jersey: Totowa: Humana Press Inc.
214. Cachau, R.E. and A.D. Podjarny, *High-resolution crystallography and drug design*. *J. Mol. Recognit.*, 2005. **18**: p. 196-202.
215. Casely-Hayford, M.A., K. Pors, L.H. Patterson, C. Gerner, S. Neidle, and M. Searcey, *Truncated azinomycin analogues intercalate into DNA*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2005. **15**: p. 653-656.
216. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 1989: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
217. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed ed. 1989: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
218. Marras, S.A.E., F.R. Kramer, and S. Tyagi, *Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes* *Nucleic Acids Research*, 2002. **30**(21): p. e122.
219. Darby, R.A.J., M. Sollogoub, C. McKeen, L. Brown, A. Risitano, N. Brown, C. Barton, T. Brown, and K. Fox, *High throughput measurement of duplex, triplex and quadruplex melting curves using molecular beacons and the LightCycler*. *Nucleic Acids Research*, 2002. **30**: p. e39.
220. Crothers, D.M., *Statistical thermodynamics of nucleic acid melting transitions with coupled binding equilibria*. *Biopolymers*, 1971. **10**(11): p. 2147-60.

221. Bartlett, M.S., *Smoothing Periodograms from Time Series with Continuous Spectra*. Nature, 1948. **161**: p. 686-687.
222. Bartlett, M.S., *Periodogram Analysis and Continuous Spectra*. Biometrika, 1950. **37**(1/2): p. 1-16.
223. Morrison, L.E. and L.M. Stols, *Sensitive fluorescence-based thermodynamic and kinetic measurements of DNA hybridization in solution*. Biochemistry, 1993. **32**(12): p. 3095-104.
224. Ellouze, C., F. Piot, and M. Takahashi, *Use of fluorescein-labeled oligonucleotide for analysis of formation and dissociation kinetics of T:A:T triple-stranded DNA: effect of divalent cations*. J Biochem., 1997. **121**(3): p. 521-6.
225. Antony, T., T. Thomas, L.H. Sigal, A. Shirahata, and T.J. Thomas, *A molecular beacon strategy for the thermodynamic characterization of triplex DNA: triplex formation at the promoter region of cyclin D1*. Biochemistry, 2001. **40**(31): p. 9387-95.
226. Anthony, N.G., *et al.*, *DNA binding of a short lexitropsin*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2004. **14**: p. 1353-1356.
227. Wang, L., A.K. Gaigalas, J. Blasic, and M.J. Holden, *Spectroscopic characterization of fluorescein- and tetramethylrhodamine-labeled oligonucleotides and their complexes with a DNA template*. Spectrochimica Acta, 2004. **Part A**(60): p. 2741-2750.
228. James, P.L., L. Le Strat, U. Ellervik, C. Bratwall, B. Nordén, T. Brown, and K.R. Fox, *Effects of hairpin polyamide on DNA melting: comparison with distamycin and Hoechst 33258*. Biophysical chemistry, 2004. **111**: p. 205-212.
229. McGhee, J.D., *Theoretical calculations of the helix-coil transition of DNA in the presence of large cooperatively binding ligands*. Biopolymers, 1976. **15** p. 1345-1375.
230. Dann, O., G. Bergen, E. Demant, and G. Volz, *Trypanocide Diamidine des 2-Phenylbenzo-furans, 2-Phenyl-indens und 2-Phenyl-indols*. Justus Liebigs Ann.Chem., 1971. **749**: p. 68-89.
231. Kapuscinski, J., *DAPI: a DNA-specific fluorescent probe*. Biotech. Histochem., 1995. **70**: p. 220-233.
232. Williamson, D.H. and D.J. Fennel, *The use of fluorescent DNA-binding agent for detecting and separating yeast mitochondrial DNA*, in *Methods in Cell Biology*, D.M. Prescott, Editor. 1975. p. 335-351.
233. Russell, W.C., C. Newman, and D.H. Williamson, *A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses*. Nature, 1975. **253**: p. 461-462.

234. Kapuscinski, J. and W. Szer, *Interactions of 4', 6-diamidine-2-phenylindole with synthetic polynucleotides*. Nucleic Acids Res, 1979. **6**(11): p. 3519-34.
235. Masotti, L., P. Cavatorta, M. Avitabile, M.L. Barcellona, J. von Berger, and N. Ragusa, *Characterization of 4'-6 diamidino-2 phenylindole (DAPI) as a fluorescent probe of DNA structure*. Ital.J.Biochemistry, 1982. **31**: p. 90-99.
236. Trotta, E., E. D'Ambrosio, G. Ravagnan, and P. M., *Simultaneous and Different Binding Mechanisms of 4*,6-Diamidino-2-phenylindole to DNA Hexamer (d(CGATCG))₂. A 1H NMR study*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(44): p. 27608-27614.
237. Manzini, G., M.L. Barcellona, M. Avitabile, and F. Quadrifoglio, *Interaction of diamidino-2-phenylindole (DAPI) with natural and synthetic nucleic acids*. Nucleic Acids Research, 1983. **11**(24): p. 8861-76.
238. Barcellona, M.L. and E. Grattont, *Fluorescence Anisotropy of DNA/DAPI Complex: Torsional Dynamics and Geometry of the Complex*. Biophysical Journal 1996. **70**: p. 2341-2351.
239. Breusegem, S.Y., R.M. Clegg, and F.G. Loontjens, *Base-sequence specificity of Hoechst 33258 and DAPI binding to five (A/T)₄ DNA sites with kinetic evidence for more than one high-affinity Hoechst 33258-AATT complex*. J Mol Biol., 2002. **315**(5): p. 1049-61.
240. Spacková, N., T.E.r. Cheatham, F. Ryjáček, F. Lankas, L. van Meervelt, P. Hobza, and J. Spöner, *Molecular dynamics simulations and thermodynamics analysis of DNA-drug complexes. Minor groove binding between 4',6-diamidino-2-phenylindole and DNA duplexes in solution*. J Am Chem Soc, 2003. **125**(7): p. 1759-69.
241. Trotta, E., N. del Grosso, M. Erba, S. Melino, D. Cicero, and M. Paci, *Interaction of DAPI with individual strands of trinucleotide repeats. Effects of replication in vitro of the AAT x ATT triplet*. Eur J Biochem., 2003. **270**(23): p. 4755-61.
242. Stokke, T. and H.B. Steen, *Fluorescence spectra of Hoechst 33258 bound to chromatin*. Biochim Biophys Acta, 1986. **868**(1): p. 17-23.
243. Latt, S.A. and J.C. Wohllieb, *Optical studies of the interaction of 33258 Hoechst with DNA, chromatin, and metaphase chromosomes*. Chromosoma, 1975. **52**(4): p. 297-316.
244. Zimmer, C. and U. Wähner, *Nonintercalating DNA-binding ligands: specificity of the interaction and their use as tools in biophysical, biochemical and biological investigations of the genetic material*. Prog Biophys Mol Biol, 1986. **47**(1): p. 31-112.
245. Kopka, M.L. and T.A. Larsen, *Nucleic Acid Targeted Drug Design*, ed. C.L. Propst and T.J. Perun. 1992.

246. Abu-Daya A, P.M. Brown, and K.R. Fox, *DNA sequence preferences of several AT-selective minor groove binding ligands*. Nucleic Acids Research, 1995. **23**(17): p. 3385-92.
247. Martin, R.F. and N. Holmes, *Use of an ¹²⁵I-labelled DNA ligand to probe DNA structure*. Nature, 1983. **302**: p. 452-454.
248. Weisblum, B. and E. Haenssler, *Fluorometric properties of the bibenzimidazole derivative Hoechst 33258, a fluorescent probe specific for AT concentration in chromosomal DNA*. Chromosoma, 1974. **46**: p. 255-260.
249. Guan, Y., R. Shi, X. Li, M. Zhao, and Y. Li, *Multiple binding modes for dicationic Hoechst 33258 to DNA*. J Phys Chem B, 2007. **111**(25): p. 7336-44.
250. Hampshire, A.J. and K.R. Fox, *The effects of local DNA sequence on the interaction of ligands with their preferred binding sites*. Biochimie, 2008. **90**(7): p. 988-98.
251. Waring, M.J., *Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids*. J Mol Biol, 1965. **13**(1): p. 269-82.
252. Hayashi, M. and Y. Harada, *Direct observation of the reversible unwinding of a single DNA molecule caused by the intercalation of ethidium bromide*. Nucleic Acids Research, 2007. **35**(19): p. e125.
253. Graves, D.E. and L.M. Velea, *Intercalative Binding of Small Molecules to Nucleic Acids*. Current Organic Chemistry, 2000. **4**: p. 915-929.
254. Frederick, C.A., L.D. Williams, G. Ughetto, G.A. van der Marel, J.H. van Boom, A. Rich, and A.H. Wang, *Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes: adriamycin and daunomycin*. Biochemistry, 1990. **29**(10): p. 2538-49.
255. Chen, K.X., N. Gresh, and B. Pullman, *A theoretical investigation on the sequence selective binding of adriamycin to double-stranded polynucleotides*. Nucleic Acids Research, 1986. **14**(5): p. 2251-67.
256. Chaires, J.B., K.R. Fox, J.E. Herrera, M. Britt, and M.J. Waring, *Site and sequence specificity of the daunomycin-DNA interaction*. Biochemistry 1987. **26**: p. 8227-8236.
257. Pullman, B., *Sequence specificity in the binding of anti-tumour anthracyclines to DNA: a success of theory*. Anticancer Drug Des., 1991. **6**(2): p. 95-105.
258. Graves, D.E. and T.R. Krugh, *Adriamycin and daunorubicin bind in a cooperative manner to deoxyribonucleic acid*. Biochemistry, 1983. **22**(16): p. 3941-7.
259. Kellogg, G.E., J.N. Scarsdale, and F.A. Fornari Jr., *Identification and hydropathic characterization of structural features affecting sequence specificity for doxorubicin intercalation into DNA double-stranded polynucleotides*. Nucleic Acids Research, 1998. **26**(20): p. 4721-32.

260. Trist, H. and D.R. Phillips, *In vitro transcription analysis of the role of flanking sequence on the DNA sequence specificity of adriamycin*. Nucleic Acids Research, 1989. **17**(10): p. 3673-88.
261. Jacobsen, J.P., J.B. Pedersen, L.F. Hansen, and D.E. Wemmer, *Site selective bis-intercalation of a homodimeric thiazole orange dye in DNA oligonucleotides*. Nucleic Acids Research, 1995. **23**(5): p. 753-760.
262. Spielmann, H.P., D.E. Wemmer, and J.P. Jacobsen, *Solution structure of a DNA complex with the fluorescent bis-intercalator TOTO determined by NMR spectroscopy*. Biochemistry, 1995. **34**(27): p. 8542-53.
263. Negri, A., *et al.*, *Antitumor activity, X-ray crystal structure, and DNA binding properties of thiocoraline A, a natural bisintercalating thiodepsipeptide*. J Med Chem, 2007. **50**(14): p. 3322-33.
264. Romero, F., F. Espliego, J.P. Baz, T.G. de Quesada, D. Grávalos, F. de la Calle, and J.L. Fernández-Puentes, *Tiocoralina, a new depsipeptide with antitumor activity produced by a marine Micromonospora. I. Taxonomy, fermentation, isolation, and biological activities*. J. Antibiot., 1997. **50**: p. 734-737.
265. Pérez Baz, J., L.M. Canedo, and J.L. Fernández-Puentes, *Tiocoralina, a novel depsipeptide with antitumor activity produced by a marine Micromonospora. II. Physico-chemical properties and structure determination*. J. Antibiot., 1997. **50**: p. 738-741.
266. Lombo, F., A. Velasco, A. Castro, F. de la Calle, A.F. Braña, J.M. Sánchez-Puelles, C. Méndez, and J.A. Salas, *Deciphering the biosynthesis pathway of the antitumor tiocoralina from a marine actinomycete and its expression in two streptomyces species*. Chembiochem, 2006. **7**: p. 366-376.
267. Waring, M.J., *Echinomycin and related quinoxaline antibiotics*. Molecular Aspects of Anticancer Drug-DNA Interactions, ed. S. Neidle and M.J. Waring. 1993, London: Macmillan & Co. 213-242.
268. Waring, M.J. and L.P.G. Wakelin, *Echinomycin: a bifunctional intercalating antibiotic*. Nature 1974. **252**: p. 653-657.
269. Ughetto, G., A.H. Wang, G.J. Quigley, G.A. van der Marel, J.H. van Boom, and A. Rich, *A comparison of the structure of echinomycin and triostin A complexed to a DNA fragment*. Nucleic Acids Research, 1985. **13**: p. 2305-2323.
270. Pommier, Y., G. Kohlhausen, C. Bailly, M. Waring, A. Mazumder, and K.W. Kohn, *DNA sequence- and structure-selective alkylation of guanine N2 in the DNA minor groove by ecteinascidin 743, a potent antitumor compound from the Caribbean tunicate Ecteinascidia turbinata*. Biochemistry, 1996. **35**(41): p. 13303-9.
271. Gago, F. and L.H. Hurley, *Devising a structural basis for the potent cytotoxic effects of Ecteinascidin 743. DNA and RNA binders- From small molecules to drugs*, ed. M. Demeunynck, C. Bailly, and W. Wilson. Vol. 2. 2002. 643-675.

272. Schoffski, P., P. Wolter, P. Clement, R. Sciot, I. De Wever, A. Wozniak, C. Stefan, and H. Dumez, *Trabectedin (ET-743): evaluation of its use in advanced soft-tissue sarcoma*. *Future Oncol.*, 2007 **3**(4): p. 381-92.
273. Zewail-Foote, M., V.S. Li, H. Kohn, D. Bearss, M. Guzman, and L.H. Hurley, *The inefficiency of incisions of ecteinascidin 743-DNA adducts by the UvrABC nuclease and the unique structural feature of the DNA adducts can be used to explain the repair-dependent toxicities of this antitumor agent*. *Chem. Biol.*, 2001. **8**: p. 1033-1049.
274. Casado, J.A., *et al.*, *The Relevance of the Fanconi Anemia Pathway in the Response of Human Cells to Trabectedin*. *Mol Cancer Ther.*, 2008.
275. Kharakoza, D.P., R.S. Khusainova, A.V. Gorelova, and K.A. Dawson, *Stoichiometry of dipalmitoylphosphatidylcholine-DNA interaction in the presence of Ca²⁺: a temperature-scanning ultrasonic study*. *FEBS Letters*, 1999. **446**: p. 27-29.
276. Tanious, F.A., D. Hamelberg, C. Bailly, A. Czarny, D.W. Boykin, and W.D. Wilson, *DNA Sequence Dependent Monomer-Dimer Binding Modulation of Asymmetric Benzimidazole Derivatives*. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004. **126**: p. 143-153.
277. Marco, E., M.H. David-Cordonnier, C. Bailly, and F. Gago, *Further insight into the DNA recognition mechanism of trabectedin from the differential affinity of its demethylated analogue ecteinascidin ET729 for the triplet DNA binding site CGA*. *J. Med. Chem.*, 2006. **49**: p. 6925-6929.
278. David-Cordonnier, M.H., *et al.*, *Covalent binding of antitumor benzoacronycines to double-stranded DNA induces helix opening and the formation of single-stranded DNA: unique consequences of a novel DNA-bonding mechanism*. *Mol Cancer Ther.*, 2005. **4**(1): p. 71-80.
279. David-Cordonnier, M.H., W. Laine, T. Gaslonde, S. Michel, F. Tillequin, M. Koch, S. Léonce, A. Pierré, and C. Bailly, *Design of novel antitumor DNA alkylating agents: the benzoacronycine series*. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 2004. **4**(2): p. 83-92.
280. David-Cordonnier, M.H., W. Laine, A. Lansiaux, M. Kouach, G. Briand, A. Pierré, J.A. Hickman, and C. Bailly, *Alkylation of guanine in DNA by S23906-1, a novel potent antitumor compound derived from the plant alkaloid acronycine*. *Biochemistry*, 2002. **41**(31): p. 9911-20.
281. Léonce, S., L. Kraus-Berthier, R.M. Golsteyn, M.H. David-Cordonnier, C. Tardy, A. Lansiaux, V. Poindessous, A.K. Larsen, and A. Pierré, *Generation of replication-dependent double-strand breaks by the novel N2-G-alkylator S23906-1*. *Cancer Res.*, 2006. **66**(14): p. 7203-10.
282. Guilbaud, N., S. Léonce, F. Tillequin, M. Koch, J.A. Hickman, and A. Pierré, *Acronycine derivatives as promising antitumor agents*. *Anticancer Drugs*, 2002. **13**(5): p. 445-9.

283. Kluza, J., A. Lansiaux, N. Wattez, M.P. Hildebrand, S. Léonce, A. Pierré, J.A. Hickman, and C. Bailly, *Induction of apoptosis in HL-60 leukemia and B16 melanoma cells by the acronycine derivative S23906-1*. *Biochem Pharmacol.*, 2002. **63**(8): p. 1443-52.
284. Michel, S., T. Gaslonde, and F. Tillequin, *Benzo[b]acronycine derivatives: a novel class of antitumor agents*. *Eur J Med Chem.*, 2004. **39**(8): p. 649-55.
285. Guilbaud, N., *et al.*, *Marked antitumor activity of a new potent acronycine derivative in orthotopic models of human solid tumors*. *Clin Cancer Res.*, 2001. **7**(8): p. 2573-80.
286. Koch, M., *From acronycine to benzo-[b]-acronycine derivatives: potent antitumor agents*. *Bull Acad Natl Med.*, 2007. **191**(1): p. 83-93.
287. Westphal, O., K. Jann, and W. Heffe, *A new synthesis of quinolizine ring systems. Dehydroquinolizinium salts*. *Arch Pharm.*, 1961. **294**(66): p. 37-45.
288. Fernandez, G., *Estudio de la interacción con ADN de compuestos potencialmente antitumorales*. 2001, Universidad de Alcalá.